

Aus dem Med. Zentrum für Innere Medizin Schwerpunkt Nephrologie

Direktor: Prof. Dr. med. J. Hoyer

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,

Standort Marburg

# **Hochregulation $\text{Ca}^{2+}$ aktivierter $\text{K}^{+}$ Kanäle in humanen T-Lymphozyten bei akuter Nierentransplantatrejektion**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Doris Kämpfe aus Bautzen

Marburg, 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 16.12.2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Joachim Hoyer

Korreferent: PD Dr. Niels Decher

# **Inhaltsverzeichnis**

<b>I.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>4</b>
<b>II.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>6</b>
<b>III.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>9</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>10</b>
1.1	Akute Rejektion nach heterologer Nierentransplantation	10
1.2	Pathophysiologie der akuten Rejektion	11
1.3	Zelluläre Mechanismen bei der Aktivierung von Lymphozyten	13
1.4	Ionenkanäle in Lymphozyten	15
1.4.1	Das Membranpotential	16
1.4.2	Calcium vermittelte Signalübertragung	16
1.4.3	Funktionelle Bedeutung von Ionenkanälen in Lymphozyten	17
1.4.4	Bedeutung der Kaliumkanäle	17
1.4.5	Die Einteilung der Ionenkanäle	17
1.4.6	Kalium-Kanäle	18
1.4.7	Ca <sup>2+</sup> -Kanäle	21
1.4.8	Veränderungen der Ionenkanäle während Aktivierung und Differenzierung von T-Lymphozyten	22
1.5	Zielsetzung	23
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>25</b>
2.1	Studiendesign	25
2.2	Isolation der Lymphozyten	26
2.2.1	Geräte und Chemikalien	26
2.2.2	Durchführung	26
2.3	Stimulation der Lymphozyten in vitro	27
2.3.1	Geräte und Chemikalien	27

2.3.2	Durchführung	27
<b>2.4</b>	<b>Elektrophysiologische Untersuchungen</b>	<b>28</b>
2.4.1	Die Patch-Clamp-Technik	28
2.4.2	Patch-Clamp-Konfigurationen	28
2.4.3	Aufbau des Messplatzes	30
2.4.4	Beschreibung des Messplatzes	30
2.4.5	Aufbau des Messkreises	31
2.4.6	Durchführung der elektrophysiologischen Experimente	32
2.4.7	Lösungen und Chemikalien	32
2.4.8	Datenaufzeichnung	33
2.4.9	Datenauswertung	34
<b>2.5</b>	<b>Statistik</b>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Elektrophysiologische Charakterisierung von Kaliumkanälen in Lymphozyten</b>	<b>35</b>
<b>3.3</b>	<b>K<sup>+</sup>-Kanalfunktion in in vitro mit OKT3-aktivierten T-Lymphozyten</b>	<b>38</b>
<b>3.4</b>	<b>K<sup>+</sup>-Kanalfunktion in Lymphozyten von Patienten nach Nierentransplantation</b>	<b>40</b>
3.4.1	Patientendaten	40
3.4.2	K <sup>+</sup> -Kanalfunktion bei Patienten ohne akute Transplantatrejektion	41
3.4.3	Verlauf bei Patienten mit akuter Transplantatabstoßung	45
3.4.4	Vergleich der Patientengruppen	51
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>54</b>
<b>4.1.</b>	<b>Charakterisierung T-lymphozytärer Kaliumströme</b>	<b>56</b>
4.1.1	K <sup>+</sup> -Kanalfunktionsmuster in peripheren Lymphozyten gesunder Probanden	56
4.1.2	K <sup>+</sup> -Kanalfunktionsmuster in OKT3-aktivierten Lymphozyten gesunder Probanden	56
<b>4.2</b>	<b>Patientenstudie</b>	<b>58</b>
4.2.1	Patientenstudie zur Funktion T-lymphozytärer K <sup>+</sup> -Kanäle nach Nierentransplantation bei Patienten ohne Transplantatrejektion	58
4.2.2	Patientenstudie zur Funktion T-lymphozytärer K <sup>+</sup> -Kanäle bei Patienten mit akuter Nierentransplantatrejektion	59
4.2.3	Verlauf der Funktion T-lymphozytärer K <sup>+</sup> -Kanäle nach erfolgreicher	

Rejektionstherapie	61
4.2.4 Vergleich der $IK_{Ca}$ -Funktion der beiden Patientengruppen	61
4.2.5 Vergleich der $K_v$ -Funktion der beiden Patientengruppen	61
4.2.6 Bedeutung der Befunde	62
<b>4.3. Stellenwert der Ergebnisse</b>	<b>64</b>
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>66</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>70</b>
<b>7 Anhang</b>	<b>77</b>
<b>8 Akademische Lehrer</b>	<b>80</b>
<b>9 Danksagungen</b>	<b>81</b>
<b>10 Ehrenwörtliche Erklärung</b>	<b>82</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>83</b>

## I. Abkürzungsverzeichnis

A/D-Wandler	Analog-Digital-Wandler
AP-1	Activation Protein 1
ATP	Adenosintriphosphat
BK <sub>Ca</sub> -Kanal	Ca <sup>2+</sup> -aktivierter K <sup>+</sup> -Kanal mit hoher Leitfähigkeit
C	Kapazität
C <sub>F</sub>	Referenzkapazität
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>frei</sub>	freie Ca <sup>2+</sup> -Konzentration
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre Ca <sup>2+</sup> -Konzentration
CD	Cluster of differentiation
CLT	Clotrimazol
CMV	Zytomegalievirus
CRAC	Calcium Release Activated Calcium Channel
CRP	C-reaktives Protein
CTX	Charybdotoxin
DAG	Diacylglycerol
1-EBIO	1-Ethyl-2-benzimidazolinone
EC <sub>50</sub>	Ca <sup>2+</sup> -Konzentration, bei der die Kanaloffenwahrscheinlichkeit halbmaximal ist
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FK506	Tacrolimus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HWI	Harnwegsinfekt
I	Stromstärke
I <sub>F</sub>	Kompensationsstrom
I <sub>M</sub>	Messstrom
IgG	Immunglobulin G
IK <sub>Ca</sub> -Kanal	Ca <sup>2+</sup> -aktivierter K <sup>+</sup> -Kanal mit intermediärer Leitfähigkeit
IL-2	Interleukin 2
IP <sub>3</sub>	Inositol-Triphosphat
JNK	Jun-N-terminale Kinase
K <sub>Ca</sub>	Kalziumabhängige Kaliumkanäle
K <sub>v</sub>	Spannungsabhängiger Kaliumkanal

MHC	Major histocompatibility complex
mRNA	Messenger-RNA
n	Anzahl der Versuche
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
OKT3	Muromonab-CD3
OPA	Operationsverstärker
ORAI1	Untereinheit des CRAC-Kanals
p	Wahrscheinlichkeit
PBS	Phosphate Buffered Saline
PIP	Phosphatidyl-Inositol-Phospholipase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
Po	Öffnungswahrscheinlichkeit
R	Widerstand
R <sub>f</sub>	Rückkopplungswiderstand
rpm	„ <i>rounds per minute</i> “; Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SHK-Dap <sup>22</sup>	Modifiziertes Stichodactyla helianthus-Peptid
SE	Standardfehler des Mittelwertes
STIM1	Stromal interaction molecule 1
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAM-34	Triarylmethan-34
U	Spannung
U <sub>AUS</sub>	Ausgangsspannung
U <sub>PIP</sub>	Pipettenspannung
U <sub>SOLL</sub>	Sollspannung
V <sub>m</sub>	Membranpotential

## II. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung der Aktivierungskaskade humaner CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten und Ionenkanäle	14
<b>Abbildung 2:</b> Schematische Darstellung des spannungsabhängigen Kaliumkanals Kv1.3.	19
<b>Abbildung 3:</b> Schematische Darstellung des kalziumabhängigen Kaliumkanals IK <sub>Ca</sub> .	21
<b>Abbildung 4:</b> Die Whole-cell-Konfiguration und das Prinzip ihrer Herstellung (verändert nach Hamill et al., 1981).	29
<b>Abbildung 5:</b> Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus und des Messkreises. OPA: Operationsverstärker, U <sub>SOLL</sub> : Sollspannung, U <sub>PIP</sub> : Pipettenspannung, U <sub>AUS</sub> : Ausgangsspannung, I <sub>M</sub> : Messstrom, I <sub>F</sub> : Kompensationsstrom, R <sub>F</sub> : Rückkopplungswiderstand, C <sub>F</sub> : Referenzkapazität	31
<b>Abbildung 6:</b> Exemplarische Stromaufzeichnung der K <sup>+</sup> -Ganzzellströme bei nicht kompensiertem basalem Hintergrundstrom eines nicht-aktivierten T-Lymphozyten aus dem peripherem Blut eines gesunden Probanden.	36
<b>Abbildung 7:</b> Reduktion der Stromstärke durch Shk-Dap <sup>22</sup> gemessen bei einem Haltepotential von 0 mV	37
<b>Abbildung 8:</b> Kaliumselektivität der Kationenauswärtsströme in ruhenden T-Lymphozyten	38
<b>Abbildung 9:</b> Dosisabhängige Reduktion der Stromstärke durch TRAM-34 gemessen bei einem Haltepotential von -40 mV	39
<b>Abbildung 10:</b> Exemplarische Darstellung der K <sup>+</sup> -Ganzzellströme von T-Lymphozyten eines gesunden Probanden nativ sowie nach Aktivierung durch OKT <sub>3</sub>	40
<b>Abbildung 11:</b> Darstellung der mittleren Zellkapazität der Patienten ohne akute Transplantatrejektion im postoperativen Verlauf. Pro Patient wurde der Mittelwert aus 5-8 Messungen ermittelt. Die n-Zahlen geben die Anzahl der Patienten am entsprechenden Untersuchungszeitpunkt an. Abweichungen der Patientenanzahl ergeben sich, wenn zu einem bestimmten Untersuchungszeitpunkt nicht von jedem Patienten Material zur Verfügung stand. Die Datenpunkte entsprechen Mittelwerten ± Standardfehler (* p<0,05, ** p<0,0001 Student-t-Test).	42
<b>Abbildung 12:</b> Darstellung der T-lymphozytären K <sup>+</sup> -Auswärtsströme bei Patienten ohne akute Transplantatrejektion im postoperativen Verlauf bei einem Haltepotential von -40 mV. Die n-Zahlen geben die Anzahl der Patienten am entsprechenden Untersuchungszeitpunkt an. Die Datenpunkte entsprechen Mittelwerten ± Standardfehler.	43
<b>Abbildung 13:</b> Darstellung der T-lymphozytären K <sup>+</sup> -Auswärtsströme der Patienten ohne akute Transplantatrejektion im postoperativen	



- Verlauf bei einem Haltepotential von 0 mV. Die n-Zahlen geben die Anzahl der Patienten am entsprechenden Untersuchungszeitpunkt an. Die Datenpunkte entsprechen Mittelwerten  $\pm$  Standardfehler (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,0001$  Student-t-Test). 44
- Abbildung 14:** Exemplarische Darstellung der  $K^+$ -Ganzzellströme von T-Lymphozyten eines Patienten präoperativ und am 7. Tag nach Transplantation ohne akute Rejektion. 44
- Abbildung 15:** Darstellung der T-lymphozytären  $K^+$ -Auswärtsströme der Patienten mit akuter Transplantatrejektion im postoperativen Verlauf bei einem Haltepotential von -40 mV. Die n-Zahlen geben die Anzahl der Patienten am entsprechenden Untersuchungszeitpunkt an. Die Datenpunkte entsprechen Mittelwerten  $\pm$  Standardfehler (\*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  Student-t-Test). 46
- Abbildung 16 und Abbildung 17:** Darstellung der T-lymphozytären  $K^+$ -Auswärtsströme der Patienten mit akuter Transplantatrejektion vergleichend vor Transplantation sowie am Tag der Diagnosestellung der akuten Rejektion bei einem Haltepotential von -40 mV sowie 0 mV. Die n-Zahlen geben die Anzahl der Patienten am entsprechenden Untersuchungszeitpunkt an. Die Datenpunkte entsprechen Mittelwerten  $\pm$  Standardfehler (\*\*\*  $p < 0,001$  Student-t-Test). 47
- Abbildung 18:** Exemplarische Darstellung der  $K^+$ -Ganzzellströme von Lymphozyten eines Patienten präoperativ und zum Zeitpunkt der Diagnosestellung der akuten Rejektion. 48
- Abbildung 19:** Darstellung der T-lymphozytären  $K^+$ -Auswärtsströme bei Patienten mit akuter Transplantatrejektion unter Rejektionstherapie bei einem Haltepotential von -40 mV jeweils am Tag der Diagnosestellung der akuten Rejektion (Tag 0) sowie am Tag 2, 6 und 12 nach Diagnosestellung. Die n-Zahlen geben die Anzahl der Patienten am entsprechenden Untersuchungszeitpunkt an. Die Datenpunkte entsprechen Mittelwerten  $\pm$  Standardfehler (\*\*\*  $p < 0,001$  Student-t-Test). 50
- Abbildung 20:** Darstellung der T-lymphozytären  $K^+$ -Auswärtsströme bei Patienten mit akuter Transplantatrejektion unter Rejektionstherapie bei einem Haltepotential von 0 mV jeweils am Tag der Diagnosestellung der akuten Rejektion (Tag 0) sowie am Tag 2, 6 und 12 nach Diagnosestellung. Die n-Zahlen geben die Anzahl der Patienten am entsprechenden Untersuchungszeitpunkt an. Die Datenpunkte entsprechen Mittelwerten  $\pm$  Standardfehler (\*\*  $p < 0,01$  Student-t-Test, \*\*\*  $p < 0,001$  Student-t-Test). 50
- Abbildung 21:** Darstellung der T-lymphozytären  $K^+$ -Auswärtsströme bei -40 mV bei einem Patienten mit akuter Transplantatrejektion sowie zusätzlicher schwerer bakterieller Infektion. 51
- Abbildung 22:** Darstellung der T-lymphozytären  $K^+$ -Auswärtsströme von Patienten ohne ( $n=40$ ) und mit ( $n=10$ ) akuter Transplantatrejektion bei einem Haltepotential von -40 mV. Die Datenpunkte

	entsprechen Mittelwerten $\pm$ Standardfehler (***) $p < 0,0001$ Student-t-Test).	53
<b>Abbildung 23:</b>	Exemplarische Darstellung der $K^+$ -Ganzzellströme von Lymphozyten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung der akuten Rejektion im Vergleich zu den $K^+$ -Ganzzellströmen eines Patienten ohne Rejektion.	53

### III. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1 :</b> Zusammensetzung der verwendeten Lösungen.	33
<b>Tabelle 2:</b> $K^+$ -Selektivität der Kationenauswärtsströme in ruhenden T-Zellen	37
<b>Tabelle 3:</b> Klinische Daten der Patientenkollektive	41

# 1 Einleitung

## 1.1 Akute Rejektion nach heterologer Nierentransplantation

Die akute Rejektion bei heterologer Nierentransplantation ist definiert als plötzliche Verschlechterung der Nierenfunktion, die mit spezifischen histopathologischen Veränderungen im Transplantat einhergeht (Vella et al. 2006). Problematisch ist, dass der Kreatininwert im Serum als Nierenfunktionsparameter erst bei bereits ausgeprägten Parenchymschäden ansteigt, so dass die Entwicklung für frühzeitige Marker einer akuten Transplantatrejektion dringend notwendig scheint.

Eine frühzeitig, d.h. bis 60 Tage nach Transplantation, auftretende akute Abstoßungsreaktion hat einen entscheidenden Einfluss auf das Überleben des Transplantats. Die Nierenfunktion kann trotz maximaler Rejektionstherapie nicht vollständig wieder hergestellt werden (Cecka et al. 1989).

Akute Abstoßungsreaktionen haben einen entscheidenden Einfluss auf das Langzeitüberleben des Transplantats. Sie sind der wichtigste Risikofaktor für die chronische Transplantatnephropathie, die die Hauptursache für einen Transplantatverlust nach dem 1. Jahr darstellt (Basadonna et al. 1993).

Inzidenz und Zeitpunkt des Auftretens einer akuten Rejektion sind u.a. abhängig von der Effektivität der jeweiligen immunsuppressiven Therapie. Der Einsatz moderner hochpotenter Immunsuppressiva hat die ursprünglich hohe Rate an akuten Rejektionen von 50-60% in den achtziger Jahren auf aktuell 17% senken können (Cecka et al. 1989, Wiland et al. 2004, BQS-Bundesauswertung 2006).

Der Verdacht auf eine akute Transplantatrejektion wird bei ansteigendem Serumkreatinin, abfallender Kreatininclearance oder Diurese gestellt. Zu diesem Zeitpunkt ist aber bereits ein irreversibler Parenchymschaden eingetreten. Eine möglichst frühe Diagnosestellung ist somit essentiell für den weiteren Verlauf.

Verschiedene Arbeiten haben mögliche frühe Marker für eine akute Transplantatrejektion untersucht. Li et al. konnten zeigen, dass eine erhöhte Konzentration an mRNA des Proteins Perforin im Urin mit einer akuten Rejektion assoziiert ist (Li et al. 2001). Eine weitere Arbeit untersuchte den Zusammenhang zwischen der Expression bestimmter Cytokine der peripheren Leukozyten und einer ablaufenden Rejektion. Bei Erhöhung der Expression von mindestens 2 der 3

untersuchten Proteine Perforin, Granzym B bzw. Fas-Ligand konnte mit einem positiven Vorhersagewert von über 90% in einem kleinen Kollektiv eine akute Transplantatrejektion erkannt werden (Vasconsellos et al. 1998).

Diese Verfahren sind bisher jedoch lediglich in Forschungsszenarien eingesetzt worden und konnten sich nicht in der klinischen Routine als gebräuchlich durchsetzen. Im klinischen Alltag stellen weiterhin die Kreatininkonzentration im Serum und die Diuresemenge die Indikatoren für eine akute Transplantatrejektion dar.

## **1.2 Pathophysiologie der akuten Rejektion**

Man unterscheidet hyperakute, akute sowie chronische Abstoßung. Während die hyperakute Form der Abstoßung unmittelbar nach erfolgter Transplantation sehr rasch abläuft, können akute und chronische Formen zu jedem beliebigen Zeitpunkt auftreten. Häufig beobachtet man in einem Transplantat auch Zeichen sowohl akuter als auch chronischer Abstoßung nebeneinander. Das histologische Bild und nicht das Zeitintervall nach Transplantation ist für die Differenzierung in akute und chronische Rejektion entscheidend. Da sich diese Arbeit mit der akuten Rejektion beschäftigt, wird auf diese im Folgenden näher eingegangen.

Histologisch unterscheidet man die akute vaskuläre von der akuten interstitiellen Abstoßung. Die akute vaskuläre Abstoßung zeichnet sich durch Einzelzellnekrosen der Blutgefäße aus und entspricht somit dem histologischen Bild einer Endarteritis. Bei dieser Form der Abstoßung wirken T-Lymphozyten entweder direkt toxisch auf die Endothelzellen oder via zytokinvermittelter Rekrutierung und Aktivierung anderer Zellen der akuten Entzündungsreaktion. Die akute vaskuläre Rejektion beruht oft auf der Anwesenheit von IgG-Antikörpern gegen Gefäßendothel und auf der Aktivierung des Komplementsystems.

Im Gegensatz dazu ist die akute interstitielle Rejektion durch das interstitielle Infiltrat monozytärer Zellen und Lymphozyten sowie den Untergang von Parenchymzellen charakterisiert. Der Ablauf der zellulären Rejektion erfolgt in zwei Phasen. Histologisch zeigt sich ein interstitielles mononukleäres Infiltrat mit Nachweis von Lymphozyten und Makrophagen, die in diesem Fall für den Zelluntergang verantwortlich sind. Bei der akuten zellulären Abstoßung können mehrere Immunzellen beteiligt sein: zytotoxische T-Lymphozyten, aktivierte Makrophagen oder Natürliche Killer Zellen (NK-Zellen).

Die akute Abstoßungsreaktion ist eine Immunreaktion des Empfängers auf die körperfremden Zellen des Transplantats. Die Immunantwort kann sowohl vom humoralen als auch vom zellvermittelten Typ sein. Im Allgemeinen überwiegen zellvermittelte Reaktionen bei der Abstoßung transplantierte Gewebe und Organe, aber spezifische Antikörper können ebenfalls zu der Immunreaktion beitragen (Mauiyyedi et al. 2002).

Durch Antigen-präsentierende Zellen sowohl des Spenders als auch des Empfängers werden den T-Lymphozyten an HLA-Moleküle gebundene körperfremde Proteine präsentiert. (Pietra, 2000). Das Erkennen körperfremder Proteine durch T-Lymphozyten des Empfängers reicht jedoch nicht aus, um eine vollständige Aktivierung des Lymphozyten zu induzieren. Eine vollständige Aktivierung kann nur erreicht werden, wenn bei der Bindung von den präsentierten fremden Proteinen gleichzeitig Signalmoleküle der Antigen-präsentierenden Zellen die T-Zelle kostimulieren. Verschiedene Signaltransduktionskaskaden, auf die im folgenden Abschnitt näher eingegangen wird, führen letztlich zu einer Hochregulation der Genexpression und damit zu einer vermehrten Ausschüttung von Interleukin 2 (Heeger, 2003). IL-2 bewirkt dann eine Steigerung der T-Zell-Proliferation, eine Beschleunigung der Ausdifferenzierung der T-Lymphozyten sowie eine Zunahme der IL-2-Rezeptoren an der Oberfläche CD8-positiver T-Lymphozyten (Kamoun et al., 2001).

Ein alternativer Mechanismus der Auslösung einer Abstoßungsreaktion besteht in der direkten Aktivierung von  $CD8^+$  T-Lymphozyten durch körperfremde antigenpräsentierende Zellen und daraus folgender Zytokinfreisetzung sowie autokriner Stimulation, Proliferation und Differenzierung zu zytotoxischen Lymphozyten (Sayegh et al. 1994).

Die Mechanismen, die zur Bildung spezifischer Antikörper gegen MHC-Moleküle führen, sind bisher weniger klar. Wahrscheinlich werden alloreaktive B-Zellen über ähnliche Mechanismen stimuliert, wie sie auch an der Aktivierung von B-Lymphozyten beteiligt sind, die mit anderen Fremdproteinen reagieren (Crespo et al. 2001).

Nach der Erkennung des körperfremden Organs kommen verschiedene Effektormechanismen der Abstoßung zum Tragen. Alloreaktive T-Lymphozyten

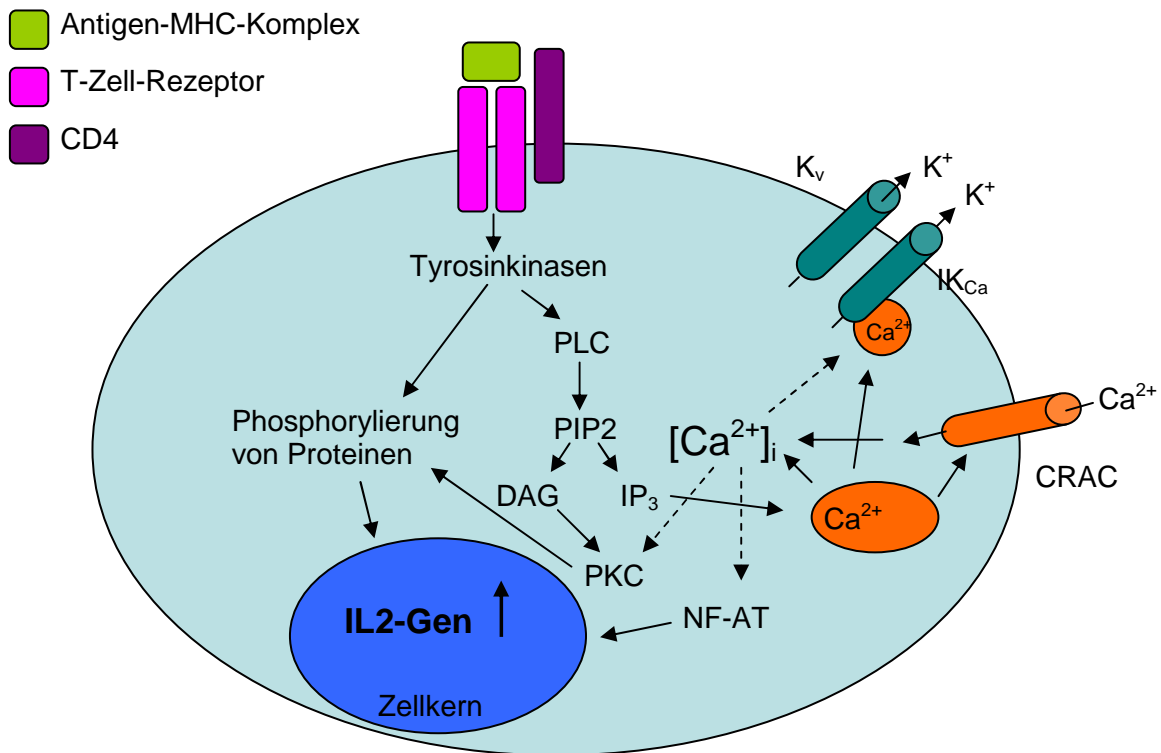
können Makrophagen aktivieren, die in das Transplantat migrieren und dort eine Entzündungsreaktion hervorrufen. Zytotoxische T-Lymphozyten wirken direkt zytotoxisch auf Endothel- und Parenchymzellen des Transplantats, indem sie kalziumabhängig durch Freisetzung von Zytotoxinen wie z.B. Perforin oder Granzym B in das Zellinnere der körperfremden Zelle die Nierenparenchymzellen lysieren.

Antikörper binden an Endothelzellen, aktivieren damit das Komplementsystem und führen mittels Zelllyse und Bildung intravaskulärer Thromben zu einer Schädigung des Organs. Durch den Fc-Teil des gebundenen Antikörpers kann eine Aktivierung von Makrophagen und NK-Zellen ausgelöst werden. Diese wiederum wirken direkt zytotoxisch auf die Zellen des Transplantats (Heeger, 2003).

Neben direkter Zytotoxizität tragen noch weitere Faktoren zu einer Schädigung des Transplantats bei. Wie bereits beschrieben schütten aktivierte T-Lymphozyten proinflammatorische Proteine aus, die zu einer Chemoattraktion und Aktivierung von mononukleären Zellen, insbesondere Makrophagen, führen. Makrophagen und T-Lymphozyten induzieren eine Hypersensitivitätsreaktion vom Spättyp. Die dadurch induzierte lokale Produktion von NO, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  und anderen Proteinen wirkt direkt toxisch auf das Transplantatgewebe und führt zu Ischämien und im weiteren Verlauf zu Fibrose und Narbenbildung (Russell 1995).

### **1.3 Zelluläre Mechanismen bei der Aktivierung von Lymphozyten**

Die Aktivierung von Lymphozyten erfolgt im Wesentlichen über zwei verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden: eine kalziumvermittelte Signaltransduktionskaskade sowie Proteinkinase C (PKC) vermittelte Signalwege. Schon die Aktivierung eines der beiden Signaltransduktionskaskaden genügt, um im Zellkern eine vermehrte Transkription bestimmter Gene hervorzurufen. Für eine vollständige Aktivierung des Lymphozyten werden aber beide Wege benötigt.



### Abbildung 1: Schematische Darstellung der Aktivierungskaskade humaner CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten und Ionenkanäle

Das Fremdprotein, welches mit dem Antigen-MHC-Komplex dem T-Zell-Rezeptor präsentiert wird, löst nach Bindung und gleichzeitiger Aktivierung kostimulatorischer Signale intrazellulär zunächst eine schnelle CD45-abhängige Phosphorylierung einer Reihe intrazellulärer Proteine aus. Im Rahmen dieser Aktivierung kommt es u.a. zur Stimulation des Enzyms Phosphatidyl-Inositol-Phospholipase (PIP), welche die Bildung von Inositol-Triphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) stimuliert.

Dadurch wird einerseits eine Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern und andererseits über membranständige Ionenkanäle (CRAC) ein Einstrom von Kalzium in die Zelle sowie eine Aktivierung der Proteinkinase C ausgelöst (Kindt, 2006).

Durch den Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration kommt es zur kalziumabhängigen Aktivierung von Calcineurin, einer Phosphatase, die den zytoplasmatischen Transkriptionsfaktor NF-AT dephosphoryliert und damit aktiviert. Dieser Transkriptionsfaktor kann nach Aktivierung in den Zellkern wandern und dort durch Bindung an das *NFAT-response-element* die Transkription von für die Lymphozytenproliferation wichtiger Gene, v.a. von Interleukin 2, fördern (Heeger, 2003).



Der zweite Signaltransduktionsweg läuft über die Aktivierung der Proteinkinase C, die wiederum verschiedene zytoplasmatische Proteine phosphoryliert und über Aktivierung des Protoonkogens Ras und von JNK-Kinasen in der Bildung von Fos/Jun-Heterodimeren resultiert. Diese Heterodimere binden an das *Activation Protein 1* (AP-1) im Zellkern und bewirken so ebenfalls die gesteigerte Transkription einer Vielzahl von Genen.

Beide Wege sind miteinander vernetzt, so ist z.B. der JNK-Aktivierungsweg ebenfalls durch eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration stimulierbar (Kindt, 2006).

Für eine vollständige und anhaltende Aktivierung von Lymphozyten ist ein signifikanter Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration unerlässlich. Hierfür ist der Einstrom von extrazellulärem Kalzium in die Zelle notwendig. Der Kalziumeinstrom wird über mehrere Ionenkanäle reguliert, die a) den Kalziumeinstrom selbst ermöglichen und b) die elektrische Triebkraft für den Kationeneinstrom herstellen müssen. Der Kalziumeinstrom erfolgt über so genannte CRAC-Kanäle und würde sich aufgrund seines depolarisierenden Effekts innerhalb von Mikrosekunden selbst limitieren. Erst ein synchron einsetzender Ausstrom von Kaliumionen durch spezifische Kaliumkanäle stellt einen Ladungsausgleich her und bildet so die elektrische Triebkraft für den Kalziumeinstrom. Diese Kaliumkanäle sind in ihrer Aktivität sehr genau durch das Membranpotential (Kv-Kanäle) und die intrazelluläre Kalziumkonzentration ( $K_{Ca}$ -Kanäle) reguliert und können dadurch sofort auf einen Kalziumeinstrom reagieren und die notwendige Feinregulation des Kalziumeinstroms einstellen (Ghanshani et al. 2000).

#### **1.4 Ionenkanäle in Lymphozyten**

Um eine funktionierende Immunantwort zu ermöglichen, müssen B- und T-Zellen in das Gewebe wandern, Antigene spezifisch erkennen, die ihnen durch spezialisierte Antigen-präsentierende Zellen dargeboten werden und biologisch aktive Peptide sezernieren. Hierfür müssen sie proliferieren sowie sich differenzieren.

### 1.4.1 Das Membranpotential

Die intrazelluläre Kalziumkonzentration ist der entscheidende intrazelluläre Signalgeber in Lymphozyten und wird durch zwei Arten von Ionenkanälen reguliert: den Kalzium-permeablen CRAC-Kanälen und den hyperpolarisierenden Kaliumkanälen, die das Membranpotential regulieren.

Das Ruhemembranpotential der T-Lymphozyten wird durch Kv-Kanäle auf ca.  $-50$  bis  $-55$  mV eingestellt (Lewis et al., 1995). Die Abhängigkeit der Öffnung dieser Kanäle von der Membranspannung schützt die Lymphozyten vor einer Depolarisation. Depolarisation verhindert aufgrund des elektrochemischen Gradienten den Calciumeinstrom und blockiert damit die Signalübertragung und Aktivierung der Zellen.

Aufgrund ihrer Calcium-abhängigen Aktivierung öffnen  $K_{Ca}$ -Kanäle sofort nach  $IP_3$ -vermittelter Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus intrazellulären Speichern. Der jetzt mögliche  $K^+$ -Ausstrom bewirkt eine Hyperpolarisation der Zelle bis  $-80$  mV. Dieses hyperpolarisierte Membranpotential bewirkt eine Verstärkung des zur Zellaktivierung und Proliferation essentiellen Kalziumeinstroms.

### 1.4.2 Calcium vermittelte Signalübertragung

Die Immunantwort beginnt mit dem Kontakt einer Antigen-präsentierenden Zelle und einem T-Lymphozyten, der den für das präsentierte Antigen passenden T-Zell-Rezeptor enthält. Die Bindung des T-Zell-Rezeptors bewirkt eine Aktivierung von Tyrosinkinasen. Dies resultiert in der Phosphorylierung und Aktivierung der Phospholipase C. Es kommt zur Freisetzung von  $IP_3$  und Diacyglyzerol, die die  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern sowie die Aktivierung der PKC bewirken. Sowohl Kalziumfreisetzung als auch Kalziumeinstrom durch CRAC-Kanäle bewirken eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration, wobei der Einstrom durch die Kanäle die dominierende Rolle spielt und für die Aufrechterhaltung der Immunantwort entscheidend ist. Innerhalb weniger Sekunden nach Bindung des präsentierten Antigens an den Rezeptor kommt es zum Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Dies führt unmittelbar zu einer Formveränderung der Zelle sowie einer veränderten Zellmotilität. Die in wesentlichen Teilen kalziumabhängige Aktivierung neuer Gene

resultiert in der Ausschüttung von Zytokinen, wie z.B. Interleukin-2, und einer Zellproliferation. (Cahalan et al., 2001).

### **1.4.3 Funktionelle Bedeutung von Ionenkanälen in Lymphozyten**

Die Kalziumabhängigkeit der Lymphozytenaktivierung wird verdeutlicht durch den Effekt eines der wichtigsten Immunsuppressiva in der Transplantationsmedizin, den Calcineurininhibitor.

Diese Substanzen blockieren hochspezifisch die Aktivierung von Calcineurin. Durch diese Blockade des zentralen kalziumabhängigen Signaltransduktionsweges kann die Lymphozytenaktivierung vollständig inhibiert werden.

### **1.4.4 Bedeutung der Kaliumkanäle**

Der Kaliumausstrom schafft den für den Kalziumeinstrom erforderlichen elektrischen Gradienten. Der Kalziumeinstrom erfolgt zum größten Teil durch CRAC Kanäle angetrieben durch ein negatives Membranpotential. Die spannungsabhängigen Kaliumkanäle der Kv-Familie sorgen für die elektrische Triebkraft des Kalziumeinstroms durch die Aufrechterhaltung des Ruhepotentials.  $K_{Ca}$ -Kanäle bewirken durch den Kaliumausstrom eine Hyperpolarisation und verstärken so den Kalziumeinstrom. Beide Subtypen von Kaliumkanälen wirken einer Depolarisation entgegen, die sich sonst durch den Kalziumeinstrom einstellen und diesen limitieren würde.

Beide Arten von Kationenkanälen und deren Subtypen werden zum besseren Verständnis nachfolgend detailliert beschrieben.

### **1.4.5 Die Einteilung der Ionenkanäle**

Seit Entwicklung der Patch-clamp-Technik durch Neher und Sakman wurden in den verschiedenen Zelltypen des menschlichen Körpers eine große Vielzahl unterschiedlicher Ionenkanäle entdeckt und klassifiziert.

Neben ihrer Ionenselektivität unterscheidet man diese Ionenkanäle hinsichtlich ihrer Leitfähigkeit und Größe sowie ihrer Rektifizierung, d.h. ob der Ionenstrom durch den Kanal präferenziell ins Zellinnere oder nach außen gerichtet ist.

Außerdem werden Ionenkanäle hinsichtlich ihres *gating*-Mechanismus charakterisiert, d.h. welche Mechanismen zur Öffnung oder zum Schließen des Kanals führen. Zum Beispiel werden spannungsabhängige Kanäle durch eine Depolarisation des Ruhemembranpotentials aktiviert während andere Kanäle durch eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration oder anderer intrazellulärer Botenstoffe aktiviert werden.

Ein weiteres Unterscheidungskriterium ist die Empfindlichkeit der Ionenkanäle gegenüber den verschiedensten spezifischen Kanalblockersubstanzen wie z.B. Schwermetallen, Toxinen oder organischen Verbindungen.

Unter Einschluss dieser verschiedenen Kriterien kann ein spezifischer Ionenkanal durch elektrophysiologische und pharmakologische Untersuchungen klassifiziert werden. (Cahalan et al., 2001)

#### **1.4.6 Kalium-Kanäle**

$K^+$ -Kanäle sind die Zellmembran überspannende Proteine, die einen selektiven  $K^+$ -Fluss in Abhängigkeit des elektrochemischen  $K^+$ -Gradienten mit einer Geschwindigkeit von  $10^6$ - $10^8$  Ionen/s über die Zellmembran ermöglichen. Dazu enthalten diese Kanäle eine mit Wasser gefüllte Pore, durch die der  $K^+$ -Fluss erfolgt, einen Filter, der für die  $K^+$ -Selektivität verantwortlich ist, sowie einen „*gating*“ Mechanismus, der dazu dient, zwischen einem offenen und einem geschlossenen Konformationszustand zu wechseln.

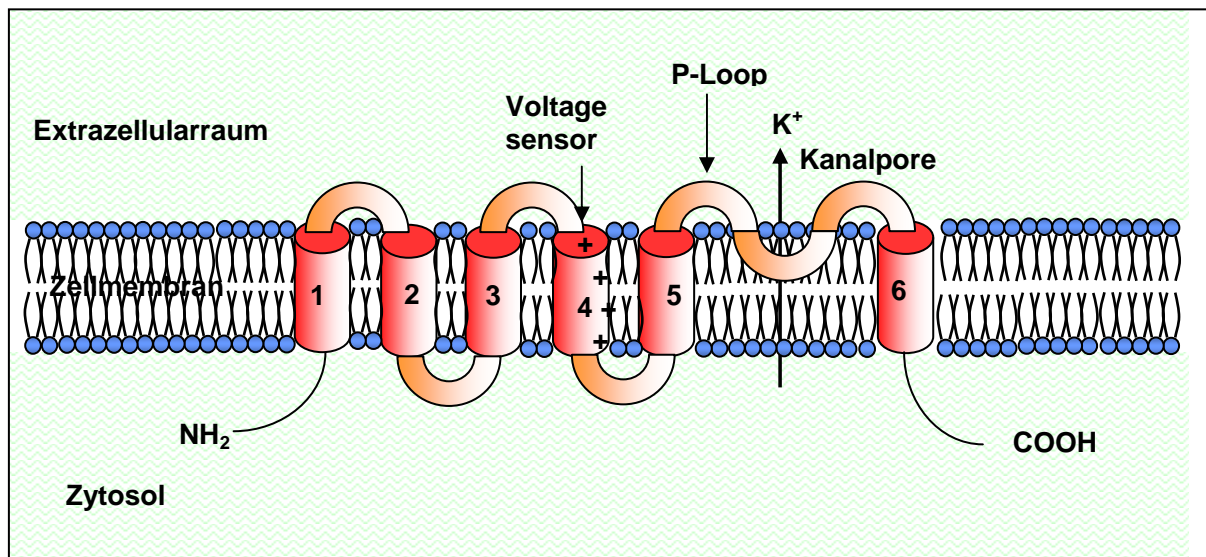
In humanen Lymphozyten sind spannungsabhängige  $K^+$ -Kanäle des Subtyps Kv1.3 sowie der  $Ca^{2+}$ -abhängige  $K^+$ -Kanal intermediärer Leitfähigkeit  $IK_{Ca}$  vertreten, die im folgenden Abschnitt näher beschrieben werden.

#### **Spannungsabhängige $K^+$ -Kanäle (Kv)**

In nicht aktivierten humanen Lymphozyten ist vor allem der spannungsabhängige  $K^+$ -Kanal Kv1.3 beschrieben, auf den im Folgenden näher eingegangen wird (Cahalan and Chandy, 1997).

Der funktionstüchtige Kv-Kanal besteht aus 4 identischen Kv1.3 Untereinheiten, die zu einem Tetramer verbunden sind. Jede Untereinheit besteht aus einem hydrophoben Kern, der sich aus 6 transmembranär angeordneten Segmenten (S1-S6) und einem „P-loop“ zwischen S5 und S6 zusammensetzt, sowie langen hydrophilen N- und C-

Termini, die sich in das Zytoplasma erstrecken (Cahalan et al. 2001, Papazian et al. 1995, Seoh et al. 1996, Glauner et al. 1999, Papazian et al., 1991). Die Öffnung des Kanals erfolgt über einen spannungsabhängigen Prozess, der vermutlich durch eine Aminosäuresequenz des Segments S4 gesteuert wird. Der genaue molekulare Steuerungsmechanismus ist noch nicht abschließend aufgeklärt. Änderungen des Membranpotentials bewirken eine Konformationsänderung des Tetramers, die in einer Kanalöffnung resultiert. Eine Besonderheit des in humanen Lymphozyten beschriebenen Kv1.3-Kanals ist seine Inaktivierung infolge langanhaltender oder wiederholter Depolarisation. Dies erfolgt durch eine Konformationsänderung an der extrazellulären Seite der Kanalpore.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des spannungsabhängigen Kaliumkanals Kv1.3.**

Der Kv-Kanal lässt sich pharmakologisch durch spezifische Antagonisten charakterisieren. Als selektive Blockersubstanz steht das modifizierte Gift der Seeanemone *Stichodactyla helianthus* ShK-Dap<sup>22</sup> zur Verfügung (Kalman et al., 1998).

### **Ca<sup>2+</sup>-abhängige K<sup>+</sup>-Kanäle**

Die Familie der Ca<sup>2+</sup>-aktivierten Kaliumkanäle (K<sub>Ca</sub>) setzt sich aus einer heterogenen Gruppe K<sup>+</sup>-selektiver Ionenkanäle zusammen. In Säugerzellen werden drei Kanalsubtypen beschrieben, die sich in ihrer Leitfähigkeit, ihren biophysikalischen und

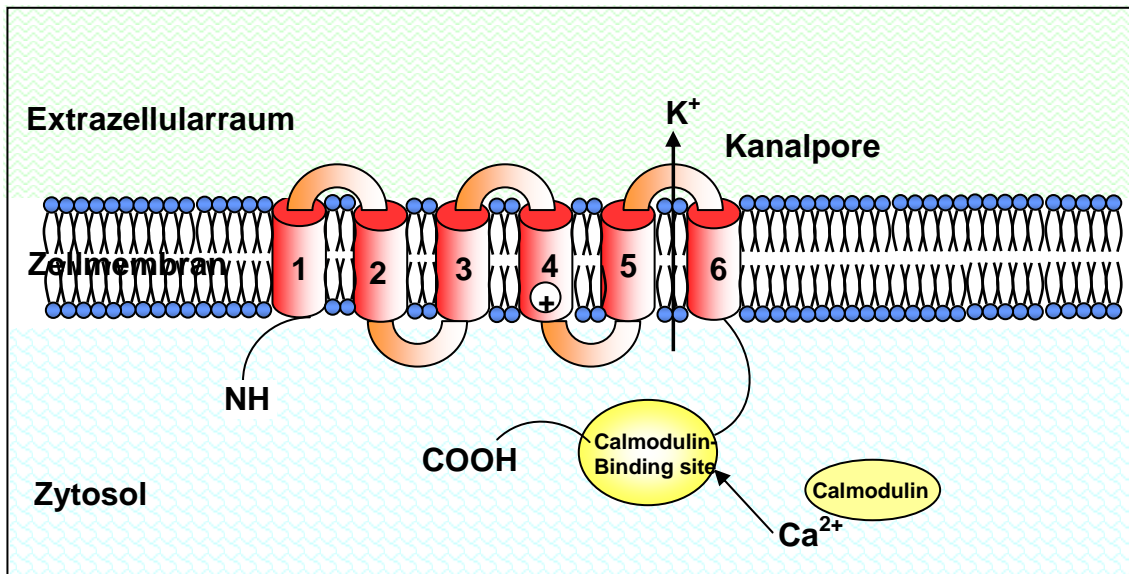
pharmakologischen Eigenschaften sowie ihrem Auftreten in unterschiedlichen Zell- und Gewebearten deutlich voneinander unterscheiden (Blatz & Magleby, 1987).

Man differenziert Kanäle mit

- a) hoher („*high-conductance channels*“, Maxi-K<sub>Ca</sub>/BK<sub>Ca</sub>),
- b) intermediärer („*intermediate-conductance channels*“, IK<sub>Ca</sub>) und
- c) geringer Leitfähigkeit („*small-conductance channels*“, SK<sub>Ca1;2;3</sub>).

In humanen Lymphozyten sind vor allem Kanäle intermediärer Leitfähigkeit nachgewiesen worden und von funktioneller Bedeutung.

**IK<sub>Ca</sub>-Kanäle** sind einwärts-rectifizierende K<sup>+</sup>-Kanäle, die sich durch eine mittlere Leitfähigkeit von 30 - 80 pS auszeichnen (Nilius & Droogmans, 2001). Ihre Aktivierung kann über eine durch Inositol-1,4,5-trisphosphat vermittelte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus intrazellulären Speichern erfolgen, die durch Agonisten wie Bradykinin, ATP und Acetylcholin induziert wird (Sauvé et al., 1990). Hierbei zeigt die Öffnungswahrscheinlichkeit P<sub>o</sub> des Kanals eine deutliche Abhängigkeit von der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. Innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe konnte für den humanen IK<sub>Ca</sub>-Kanal ein EC<sub>50</sub>-Wert für die Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität von  $0,512 \pm 0,003 \mu\text{M}$  [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> bestimmt werden. Im Gegensatz zum BK<sub>Ca</sub>-Kanal ist der IK<sub>Ca</sub>-Kanal nicht spannungsreguliert. Dies bedeutet, dass der Kanal auch bei negativen Membranpotentialen aktivierbar ist und seine Aktivierung somit stark hyperpolarisierend wirkt.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des kalziumabhängigen Kaliumkanals  $IK_{Ca}$ .**

Pharmakologisch lässt sich der  $IK_{Ca}$ -Kanal durch spezifische Agonisten und Antagonisten charakterisieren. Während 1-Ethyl-2-Benzimidazolinon (1-EBIO) als selektiver Öffner des Kanals dient, lässt sich der  $IK_{Ca}$ -Strom durch den  $K_{Ca}$ -Inhibitor Charybdotoxin (CTX) und selektiv durch das Antimykotikum Clotrimazol (CLT) und das Clotrimazol-Analogon TRAM-34 inhibieren (Devor et al., 1996; Wulff et al., 2000).

#### 1.4.7 $Ca^{2+}$ -Kanäle

In Lymphozyten konnte eine Gruppe von  $Ca^{2+}$ -Kanälen identifiziert werden, die indirekt durch verschiedene Stimuli aktiviert werden (z.B.  $IP_3$ , Ionomycin) (Hoth et al., 1992, Zweifach et al., 1993). Diese Stimuli führen zu einer Calciumfreisetzung aus intrazellulären Calciumspeichern. Die dadurch bewirkte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führt zur Öffnung der in der Zellmembran lokalisierten CRAC-Kanäle. Durch den CRAC-Kanal fließt ein kleiner Strom von  $Ca^{2+}$ -Ionen in die Zelle, der das Calciumsignal aufrecht erhält und somit essentiell zur Aktivierung der Lymphozyten beiträgt.

Die molekulare Identität der CRAC-Kanäle konnte bisher nicht abschließend geklärt werden (Cahalan et al., 2001). Da die Aktivierung der CRAC-Kanäle sehr langsam verläuft, wird eine mögliche Insertion des Kanals, der in zytoplasmatischen Vesikeln internalisiert vorliegt, nach entsprechender Stimulation durch die Speicherentleerung diskutiert (Cahalan et al., 2001).

Erst in neueren Studien konnte der Aktivierungsmechanismus der CRAC-Kanäle detaillierter aufgeklärt werden (Parekh, 2006, Feske et al., 2006, Vig et al., 2006). Zur Aktivierung des Kalziumeinflusses aus intrazellulären Speichern ist das Protein STIM1 essentiell. Dieses überspannt die Membran des endoplasmatischen Retikulums und kann über eine Kalzium-Bindungsstelle die Kalziumkonzentration im endoplasmatischen Retikulum messen. Bei sinkenden Kalziumkonzentrationen wird STIM1 in die Zellperipherie abgegeben und kann die Aktivierung zellmembranständiger CRAC-Kanäle bewirken (Roos et al., 2005, Liou et al., 2005). STIM1 allein scheint jedoch für eine vollständige Aktivierung der CRAC-Kanäle nicht ausreichend zu sein.

Im Jahr 2006 konnte erstmals ein Gen identifiziert werden, welches eine essentielle Komponente des CRAC-Kanals bildet. Das beschriebene Gen kodiert für das Molekül ORAI1. Ob ORAI1 bereits dem kompletten CRAC-Kanal entspricht oder lediglich eine Teilkomponente des Kanals darstellt, konnte bisher nicht abschließend geklärt werden (Parekh, 2006, Feske et al., 2006, Vig et al., 2006).

#### **1.4.8 Veränderungen der Ionenkanäle während Aktivierung und Differenzierung von T-Lymphozyten**

Humane T-Lymphozyten enthalten im Ruhezustand ca. 300-400 Kv-Kanäle (DeCoursey et al., 1984; Matteson et al., 1984; Schlichter et al., 1986). Diese Zahl ändert sich während des Aktivierungsprozesses nur wenig. Im Gegensatz dazu enthalten ruhende Lymphozyten nur ca. 10  $IK_{Ca}$ -Kanäle. Bei Zellaktivierung kommt es zu einer starken Hochregulation der Kanaldichte auf ca. 500 Kanäle/Zelle. Diese Zunahme wird über PKC abhängige Signaltransduktionswege vermittelt und geht einher mit einer Beteiligung der Transkriptionsfaktoren Ikaros und AP-1. Gleichzeitig erhöht sich die Nummer der CRAC-Kanäle um das 10fache. Während in ruhenden T-Zellen nur ca. 10-15 Kanäle pro Zelle vorhanden sind, kommt es sich in aktivierten Lymphozyten zu einer signifikanten Steigerung der Expression des Kanals, die in einer Dichte von ca. 150 Kanälen pro Zelle resultiert (Desai et al., 2000; Jaeger et al., 2000; Fanger et al., 2001).



## 1.5 Zielsetzung

Die akute Abstoßungsreaktion stellt eine entscheidende Gefährdung für das Transplantatüberleben dar. Darüber hinaus ist die akute Rejektion der bedeutendste Risikofaktor für eine chronische Transplantatnephropathie, welche die Hauptursache für einen Transplantatverlust nach dem ersten Jahr darstellt.

Das Verständnis des Mechanismus der lymphozytären Aktivierung und der Früherkennung dieses Prozesses können entscheidende Fortschritte für die klinische Behandlung von nierentransplantierten Patienten darstellen.

Die Abstoßung wird durch die Aktivierung von  $CD4^+$  T-Lymphozyten durch körperfremde antigenpräsentierende Zellen aus dem Interstitium des Transplantats eingeleitet. Veränderungen der  $K^+$ -Kanalfunktionsmuster scheinen hierbei einen wesentlichen Schritt bei der T-Zellaktivierung und Proliferation darzustellen.

Bisherige Erkenntnisse zu diesen Veränderungen der  $K^+$ -Kanalfunktionsmuster beruhen auf Untersuchungen an *in vitro* stimulierten T-Zellen. So scheint die Proliferation und Aktivierung humaner T-Lymphozyten *in vitro* insbesondere mit einer Hochregulation von  $IK_{Ca}$ -Kanälen einherzugehen und die T-Zellaktivierung von dieser Kanalexpressionsveränderung abhängig zu sein (Ghanshani et al., 2000; Khanna et al., 1999). So konnten T-Zellaktivierungs- und Proliferationsprozesse durch selektive  $K^+$ -Kanal Inhibitoren *in vitro* unterdrückt werden.

In wieweit Veränderungen der T-zellulären  $K^+$ -Expression und Veränderungen der Funktionsmuster *in vivo* auftreten, ist bisher nicht untersucht. Ein übergeordnetes Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher festzustellen, ob bei akuten Transplantabstoßungsprozessen bei nierentransplantierten Patienten Veränderungen der  $K^+$ -Kanalfunktionsmuster frühzeitig auftreten. Mögliche Änderungen der Zusammensetzung der  $K^+$ -Kanäle im postoperativen Verlauf könnten eventuell bereits frühzeitig einen neuen Indikator für eine drohende akute Transplantatrejektion darstellen.

**In der vorliegenden Arbeit sollen dazu folgende Hypothesen geprüft werden:**

**1. Liegt eine Veränderungen der  $K^+$ -Kanalfunktionsmuster im postoperativen Verlauf nach Nierentransplantation vor?**

Analyse der  $K^+$ -Kanalfunktion in T-Lymphozyten frisch nierentransplanterter Patienten sowie Veränderungen der  $K^+$ -Kanalfunktion bei akuter Transplantatrejektion

*Hierbei sollen Lymphozyten nierentransplanterter Patienten sowohl präoperativ als auch im postoperativen Verlauf an den Tagen 1, 3, 7, 14 und 21 elektrophysiologisch und unter Einsatz spezifischer Blockersubstanzen untersucht werden.*

*Im Fall einer Rejektion sollen Lymphozyten zusätzlich am Tag der Rejektion (definiert als Tag der Biopsie und gleichzeitig des Therapiebeginns) und an den folgenden Tagen 2, 6 und 12 nach Biopsie elektrophysiologisch und pharmakologisch hinsichtlich der  $K^+$ -Kanalaktivität analysiert werden.*

**2. Sind diese beobachteten Veränderungen der  $K^+$ -Kanalfunktion vergleichbar mit Veränderungen der  $K^+$ -Kanalfunktion nach Aktivierung der T-Lymphozyten *in vitro*?**

Charakterisierung von  $K^+$ -Kanal-Funktionen in T-Lymphozyten gesunder Probanden sowie Veränderung der  $K^+$ -Kanalfunktion bei Aktivierung *in vitro*

*Hierzu sollen zunächst die  $K^+$ -Kanal-Funktionen von nicht aktivierten Lymphozyten gesunder Probanden elektrophysiologisch mittels Whole-cell-Patch-clamp-Methodik und pharmakologisch mit Hilfe spezifischer Ionenkanalmodulatoren analysiert werden. Des Weiteren sollen Lymphozyten mit dem T-Zell-Rezeptor-Antikörper OKT<sub>3</sub> aktiviert werden, um dann mittels elektrophysiologischen und pharmakologischen Methoden erneut die  $K^+$ -Kanäle zu untersuchen und zu analysieren.*

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Studiendesign

In der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine prospektive Beobachtungsstudie, in welcher Lymphozyten terminal niereninsuffizienter Patienten unmittelbar vor und innerhalb Zeitraum von 3 Wochen nach erfolgter Nierentransplantation elektrophysiologisch untersucht wurden. Eingeschlossen wurden alle 46 Patienten, die im Zeitraum vom 01.11.01 bis 31.12.02 nierentransplantiert wurden und postoperativ eine akute Transplantatrejektion durchliefen oder rejektionsfrei blieben. Zusätzlich wurden die 5 Patienten eingeschlossen, die in diesem Zeitraum aufgrund einer akuten Transplantatabstoßung stationär behandelt wurden.

Parameter wie Blutbild, Serumkreatinin, CRP, Cyclosporin A-Spiegel, Serumkalium, sowie 24 h Urinvolumen, Blutdruck und Temperatur wurden täglich kontrolliert. Weiterhin wurde in regelmäßigen Abständen der Zytomegalievirus (CMV)-Status des Patienten bestimmt.

Es erfolgte eine enge klinische Überwachung der Patienten, um mögliche Komplikationen wie Harnwegsinfekte (HWI) und andere Infektionen, Hämatome, Lymphozelen oder CMV Infektionen rechtzeitig zu erkennen. Die Perfusion der Nieren wurde direkt postoperativ mittels farbkodierter Dopplersonographie überprüft. Harnwegsinfekte wurden zunächst kalkuliert und im Verlauf nach Testung entsprechend des Antibiotogramms resistenzgerecht antibiotisch behandelt.

Jeweils am Tag der Transplantation präoperativ sowie 1, 3, 7, 14 und 21 Tage postoperativ wurde den Patienten zusätzlich zur täglichen Routineblutentnahme 10 ml venöses Blut mit einem Vacutainersystem in ein mit Heparin vorbehandeltes Röhrchen abgenommen. Aus diesem wurden sofort die Lymphozyten isoliert und innerhalb von 3 Stunden nach Isolation elektrophysiologisch untersucht. Bei klinischem Verdacht auf Rejektion, d.h. bei Anstieg des Serumkreatinins oder Rückgang der Diurese, wurde für zusätzliche Lymphozytenuntersuchungen ebenfalls Blut abgenommen und untersucht. Wenn sich nach Biopsie durch die histologische Untersuchung des Biopsats der Verdacht bestätigte, wurden die Lymphozyten des Patienten am Tag 2, 6 und 12 nach Diagnosestellung und Beginn der akuten Rejektionstherapie untersucht.

Die Standardimmunsuppression nach Transplantation bestand aus Cyclosporin A, Mycophenolatmofetil und Prednisolon. Bei histologisch gesicherter akuter Rejektion

wurde mit einem Steroidstoßschema behandelt und parallel die Immunsuppression von Cyclosporin A auf Tacrolimus umgestellt.

## 2.2 Isolation der Lymphozyten

### 2.2.1 Geräte und Chemikalien

- Brutschrank: CO<sub>2</sub> –Inkubator BB 6060 (Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Sterilbank: Sterilbank Gemini (Karow, Berlin)
- Zentrifuge: Heraeus Instruments (Osterode, Deutschland)
- Sonstiges Labormaterial: Standardlaborgeräte
- Ficoll Paque: Amersham Pharmacia Biotech, (Little Chalfont, Großbritannien)
- Kulturmedium: RPMI 1640 Medium: versetzt mit 3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 4,5 g/l Glucose, 1,028 g/l N-Acetyl-L-Alanyl-L-glutamin, 1 mM Natrium-Pyruvat, 20 ml/l Streptomycin/ Penicillin: Biochrom KG, Berlin
- PBS ohne Ca<sup>2+</sup>/ Mg<sup>2+</sup> (PBS): Biochrom KG, Berlin
- *Red Cell Lysis Buffer*: 8,29 g/l NH<sub>4</sub>Cl, 1,0 g/l KHCO<sub>3</sub>, 0,372 g/l EDTA Titriplex III

### 2.2.2 Durchführung

Für die Isolation der Lymphozyten wurden 10 ml frisches, heparinisiertes venöses Vollblut mit 10 ml PBS durchmischt und in einem Zentrifugenröhrchen auf 20 ml Ficoll Paque aufgeschichtet. Danach erfolgte eine dreißigminütige Zentrifugation bei 1200 rpm. Die Zentrifugation erfolgte ohne Bremse bei einer Temperatur von 4°C, um eine zusätzliche Aktivierung der Lymphozyten während der Isolation zu vermeiden. Während dieser Zentrifugation trennte sich der Inhalt des Zentrifugenröhrchens in vier verschiedenen Schichten auf. Die unterste Schicht bildeten die Erythrozyten, darauf folgte die Ficoll Paque Lösung, die die dünne Schicht der Leukozyten trug, die letzte Schicht enthielt das Serum. Die Leukozytenschicht wurde mit einer 5 ml Pipette sorgfältig abgesaugt und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. In diesem wurden die Lymphozyten einmal mit 50 ml PBS gewaschen. Nach einer zweiten Zentrifugation bei 1600 rpm für 10 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 3 ml Red Cell Lysis Buffer resuspendiert. Es folgte eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur zur Lyse der verbliebenen Erythrozyten. Danach wurden die Leukozyten ein weiteres

Mal mit 50 ml PBS gewaschen und anschließend bei 1600 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und in den Brutschrank mit 37° C und 5 Vol% CO<sub>2</sub> in eine wasserdampfgesättigten Atmosphäre überführt. Nach einer Inkubation über 90 min, die dem Anheften der Makrophagen und Granulozyten an der Oberfläche der beschichteten Kulturschale diente, wurde das Medium mit den darin enthaltenen Lymphozyten abgenommen, in ein neues Gefäß überführt und im oben beschriebenen Brutschrank bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

## 2.3 Stimulation der Lymphozyten *in vitro*

### 2.3.1 Geräte und Chemikalien

- Brutschrank: CO<sub>2</sub>-Inkubator BB 6060 (Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Sterilbank: Sterilbank Gemini (Karow, Berlin)
- Zentrifuge: Heraeus Instruments (Osterode, Deutschland)
- Sonstiges Labormaterial: Standardlaborgeräte
- Kulturmedium: RPMI 1640 Medium: versetzt mit 3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 4,5 g/l Glucose, 1,028 g/l N-Acetyl-L-Alanyl-L-glutamin, 1 mM Natrium-Pyruvat, 20 ml/l Streptomycin/ Penicillin: Biochrom KG, Berlin
- PBS ohne Ca<sup>2+</sup>/ Mg<sup>2+</sup> (PBS): Biochrom KG, Berlin
- Monoklonaler Anti-CD3 Antikörper, Klon UCHT-1, hergestellt in Mäusen; purifiziertes Immunglobulin in Pufferlösung: Sigma-Aldrich, Hamburg
- Anti-Mouse IgG (Fab spezifischer) Antikörper, produziert in Ziegen, isolierter Antikörper in Pufferlösung: Sigma-Aldrich, Hamburg

### 2.3.2 Durchführung

Die *in vitro* Aktivierung der Lymphozyten erfolgte in Platten mit 24 Reaktionsgefäßen (*wells*). Zunächst wurde je 1 ml Goat-Anti-Maus Antikörper in einer Konzentration von 10 µg/ml in die *wells* gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 4°C wurden die nun an den Boden der *wells* adhärennten Antikörper mehrfach mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden 500 ng OKT3 zur Lymphozytenstimulation hinzugegeben. Nach einer erneuten Inkubationszeit von 30 Minuten bei 4 °C wurden die Platten gewaschen und mit RPMI-Medium bestückt.

Zur Aktivierung der Lymphozyten wurden diese in einer Konzentration von  $10^5$  Zellen in RPMI-Medium in die *wells* überführt und 48 h im Brutschrank inkubiert.

## 2.4 Elektrophysiologische Untersuchungen

### 2.4.1 Die Patch-Clamp-Technik

Mit der 1976 von Sakmann und Neher entwickelten Patch-Clamp-Technik lassen sich die Funktionen einzelner Ionenkanäle in Zellmembranen identifizieren (Hamill et al., 1981; Neher und Sakmann, 1976). Durch das Anlegen eines Unterdrucks an eine haarfein ausgezogene Glaskapillare wird ein kleiner Zellmembranabschnitt, der so genannte Patch, angesaugt, so dass ein stabiler Kontakt zwischen Glas- und Membranoberfläche entsteht. Auf diese Weise wird das Membranstück elektrisch effektiv von der Umgebung isoliert, wobei der elektrische Widerstand zwischen Pipetteninnerem und der Zellmembran im Bereich mehrerer Gigaohm liegt („*Seal*“). Diese hochohmige elektrische Abdichtung reduziert Leckströme zwischen Pipette und Membran auf ein Minimum und ermöglicht somit die Auflösung kleinster Ströme durch die in der Membran des Patches enthaltenen Ionenkanäle.

Die Patch-Clamp-Technik stellt ein spezielles Verfahren der Voltage-Clamp-Methode dar. Mit Hilfe einer Spannungsklemme, dem so genannten Patch-Clamp-Verstärker, wird das Membranpotential auf einen definierten Wert geklemmt. Kommt es zum Öffnen oder Schließen von Ionenkanälen, erzeugt der Verstärker einen Kompensationsstrom, der genau so groß ist wie der durch die Membran fließende Strom, so dass Änderungen des Sollpotentials verhindert werden. Dieser Kompensationsstrom spiegelt den Ionenstrom durch die Ionenkanäle exakt wieder und liefert Rückschlüsse auf die Leitfähigkeit der Ionenkanäle der untersuchten Membran.

### 2.4.2 Patch-Clamp-Konfigurationen

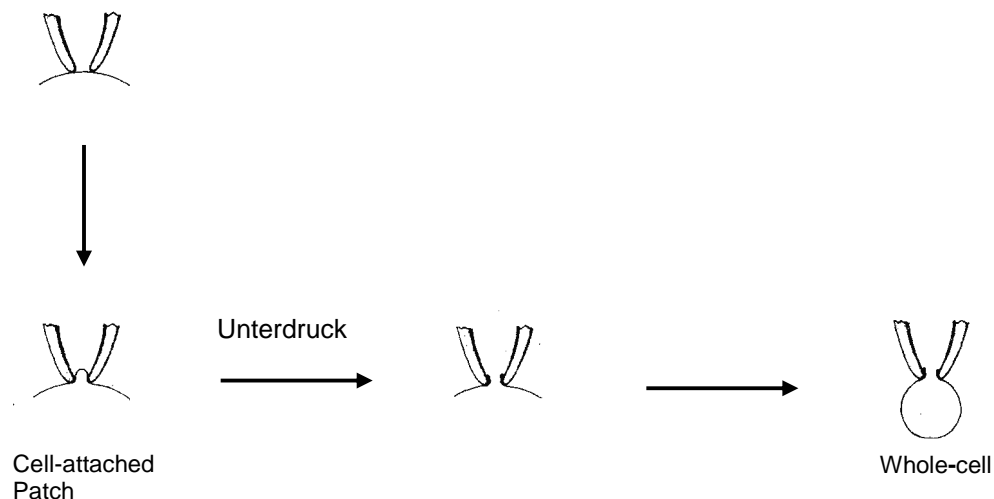
Für die Messung von Ionenströmen stehen mehrere Messkonfigurationen zur Verfügung, die durch verschiedene Manipulationen an dem Membranfleck (*Patch*) ermöglicht werden.

Es können selektiv Ionenkanäle in dem Patch selbst (*Cell-attached-Konfiguration*) oder in der gesamten Zelle (*Whole-Cell-Konfiguration*) abgeleitet werden. In der *Inside-out*-

*Konfiguration* und *Outside-out-Konfiguration* können durch die Extraktion des Membranbereichs im Patchareal Kanäle in der Membran zellfrei gemessen werden. Dabei ist entweder die ursprünglich zytoplasmatische Seite oder die extrazelluläre Oberfläche der Zellmembran der Badlösung zugewandt. Da in der vorliegenden Arbeit nur die Ganzzelleableitung zur Anwendung kam, wird auf diese im Folgenden näher eingegangen.

Um in die *Whole-Cell-Konfiguration* zu gelangen, stellt man zunächst einen *Cell-attached-Patch* her. Anschließend legt man im Pipetteninneren einen Unterdruck an, so dass die Zellmembran im Bereich der Pipettenöffnung durchbrochen wird. Die Lösung im Inneren der Pipette steht somit direkt mit dem Zytosol in Verbindung. Dies ermöglicht durch das Einbringen unterschiedlich konzentrierter Ionenlösungen eine genaue Kontrolle des intrazellulären Milieus und somit der elektrochemischen Gradienten (Pusch und Neher, 1988; Marty und Neher, 1983).

Die bei der Ganzzelleableitung gemessenen Ströme und Potentiale geben die Summe der Einzelkanalströme der gesamten Zellmembran wider. Einerseits ist es möglich, durch das Klemmen der Zelle auf verschiedene Potentiale den Gesamtzellstrom zu registrieren; andererseits kann über eine Stromklemme das Zellpotential bestimmt werden.



**Abbildung 4: Die Whole-cell-Konfiguration und das Prinzip ihrer Herstellung (verändert nach Hamill et al., 1981).**

### 2.4.3 Aufbau des Messplatzes

#### Geräte und Materialien

- Messtisch: Schwingungsisolierter Tisch (Physik Instrumente, Waldborn, Deutschland)
- Mikroskop: Axiovert 100 (Zeiss, Deisenhofen, Deutschland)
- Verstärker: Computergesteuerter EPC-9 Patch-Clamp-Verstärker mit 4-Pol-Besselfilter (HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland)
- Mikromanipulator: Luigs und Neumann GmbH, Ratingen, Deutschland
- Puller: DMZ-Universal-Puller (Zeitz-Instrumente, Augsburg, Deutschland)
- Patch-Pipetten: Borosilikatkapillaren; Länge: 7,5 cm; Innendurchmesser: 0,9 mm; Wandstärke: 0,3 mm (Clark Electromedical Instruments, Pangbourne, Großbritannien)
- Experimentierbad: Badkammer für 2 ml Volumen (Wolfgang Hampel, Neu Isenburg, Deutschland)
- Mess- und Referenzelektrode: Chlorierte Silberdrähte (Silber/Silberchlorid-Elektrode)

### 2.4.4 Beschreibung des Messplatzes

Um mechanische Schwingungen und Erschütterungen zu vermeiden, befanden sich das Mikroskop und die Messanordnung auf einem schwingungsgedämpften Messtisch.

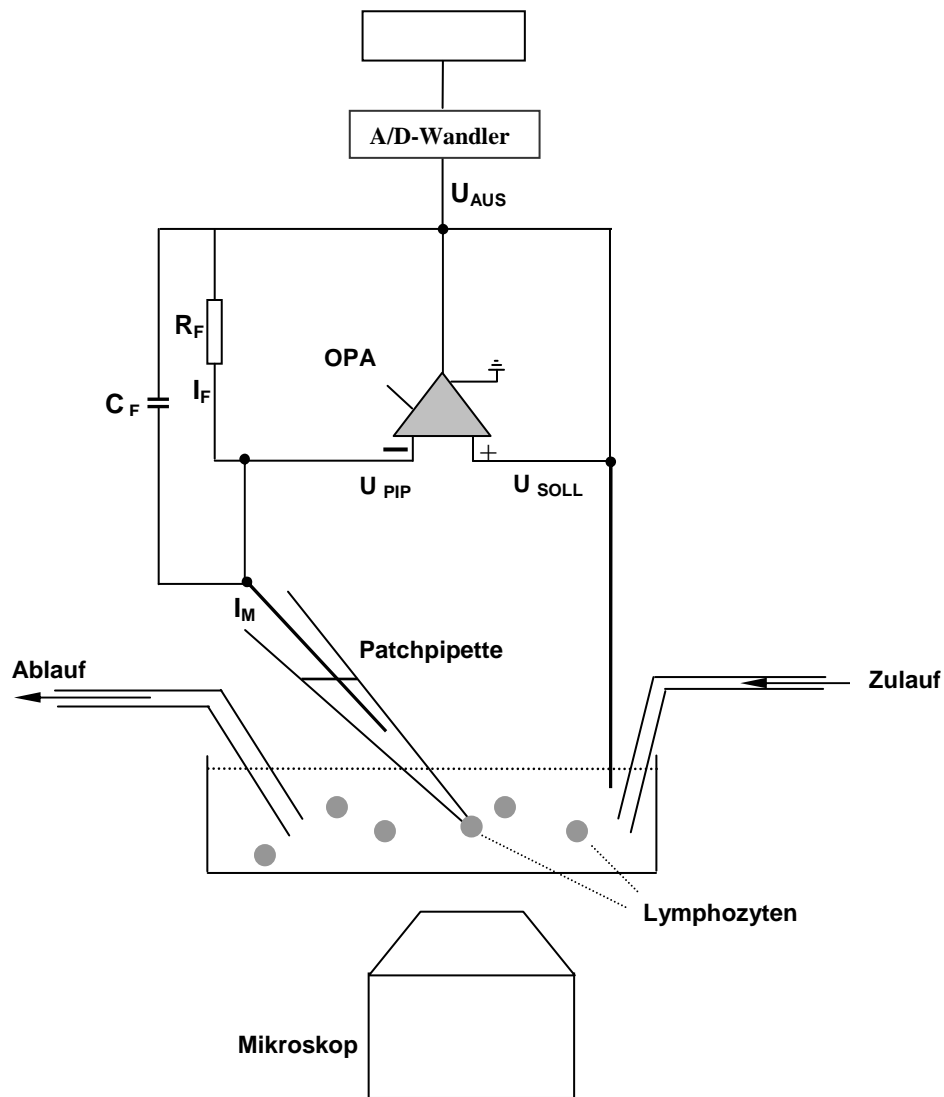
Ein Faradaykäfig über der Messapparatur diente als Abschirmung gegenüber elektromagnetischen Wellen. Alle leitenden Komponenten wurden über einen gemeinsamen Massepunkt geerdet.

Für die optische Kontrolle der Versuche (Sealbildung) kam ein inverses Mikroskop zur Anwendung, auf dessen Objektisch die Untersuchungskammer mit Zu- und Ablauf für die Badlösung befestigt war.

Der Patch-Clamp-Vorverstärker und der Pipettenhalter waren auf einem Mikromanipulator montiert, mit dem grobe Bewegungen der Patchpipette in alle drei Raumachsen ermöglicht wurden. Piezoelemente sorgten für die Feinsteuerung der Messpipette im  $\mu\text{M}$ -Bereich.

Über ein Schlauchsystem, das mit einer Wassersäule verbunden war, konnten die Druckverhältnisse in der Messpipette für verschiedene Patchmanöver variiert werden.





**Abbildung 5: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus und des Messkreises. OPA: Operationsverstärker,  $U_{SOLL}$ : Sollspannung,  $U_{PIP}$ : Pipettenspannung,  $U_{AUS}$ : Ausgangsspannung,  $I_M$ : Messstrom,  $I_F$ : Kompensationsstrom,  $R_F$ : Rückkopplungswiderstand,  $C_F$ : Referenzkapazität**

### 2.4.5 Aufbau des Messkreises

Der Aufbau des elektrophysiologischen Messplatzes ist schematisch als elektrisches Schaltbild in Abb. 5 wiedergegeben.

Der Schaltkreis stellt einen Strom-Spannungswandler dar. An den Eingängen des Operationsverstärkers (OPA) liegen die Spannungen der Pipette  $U_{PIP}$  und die Sollspannung  $U_{SOLL}$  an. Weichen die beiden Spannungen voneinander ab, so liegt am Ausgang des OPA die Spannung  $U_{AUS}$  an, die proportional zu deren Differenz ist, dabei

aber noch extrem verstärkt wird. Da der invertierte Eingang des OPA mit seinem Ausgang über einen Rückkopplungswiderstand  $R_f$  verschaltet ist, fließt hier aufgrund der Potentialdifferenz der Kompensationsstrom  $I_f$ . Dieser hat bei entgegen gesetzter Polarität den Selben Betrag wie der Messstrom  $I_m$  und fließt so lange, bis Soll- und Pipettenspannung angeglichen sind.

Die Ausgangsspannung wird an eine Steuereinheit weitergeleitet und bei bekanntem  $R_f$  nach dem Ohmschen Gesetz  $U = R \cdot I$  in den Strom umgerechnet.

#### **2.4.5 Patchpipetten und Elektroden**

Die Patchpipetten wurden aus Borosilikatkapillaren mit einem automatischen Pipettenziehgerät horizontal in drei Erhitzungs- und Zugintervallen gezogen. In einem vierten Arbeitsgang wurden die Pipettenspitzen durch nochmaliges Erhitzen poliert.

Die Pipetten wiesen in symmetrischen KCl-Lösungen einen Eingangswiderstand von 3,5 bis 4,5 M $\Omega$  auf.

Als Mess- und Referenzelektroden wurden gleichmäßig chlorierte Silberdrähte verwendet.

#### **2.4.6 Durchführung der elektrophysiologischen Experimente**

Frisch isolierte Lymphozyten wurden in die mit PBS gefüllte Badkammer überführt und sanken innerhalb von 5 Minuten auf den Boden der Kammer. Die Zellen waren abgerundet und adhärten nicht auf dem Boden der Badkammer. Für die Patch-clamp-Untersuchungen wurden nur solche Zellen verwendet, die mikroskopisch keine erkennbare Vesikulierung aufwiesen. War ein experimenteller Durchgang nach 30-40 Minuten nicht abgeschlossen, wurden die Zellen durch neue ersetzt.

Die Patch-Clamp-Untersuchungen wurden bei Raumtemperatur vorgenommen.

#### **2.4.7 Lösungen und Chemikalien**

Alle verwendeten Lösungen wurden in MILLIPORE<sup>®</sup>-destilliertem Wasser angesetzt.

Die Chemikalien wurden von der Firma Sigma, Deisenhofen, Deutschland, bezogen.

**Tabelle 1 : Zusammensetzung der verwendeten Lösungen.**

	KCl-Pipettenlösung	NaCl-Badlösung
KCl	135	3
MgCl <sub>2</sub>	4	0,4
HEPES	5	-
EGTA	1	-
CaCl <sub>2</sub>	0,955	0,7
NaCl	-	137
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	4,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	1,5
pH	7,2	7,4

Die Angaben beziehen sich auf die Konzentrationen der einzelnen Substanzen in mmol/l.

Die Berechnung der freien Ca-Konzentration erfolgte nach Fabiato & Fabiato (1979).

Es wurden Pipettenlösungen mit  $[Ca^{2+}]_{\text{frei}}$  von **3,0  $\mu\text{Mol}$**  angewendet.

#### Blockersubstanzen:

Die verwendeten Blockersubstanzen TRAM-34 und Shk-Dap<sup>22</sup> wurden von H. Wulff, Irving, Kalifornien bezogen.

### **2.4.8 Datenaufzeichnung**

Die Membranströme wurden mit einem EPC-9-Verstärker aufgenommen, verstärkt und in entsprechende Spannungen konvertiert.

Die Untersuchung der Gesamtzellströme erfolgte mit Hilfe von kontinuierlichen Spannungsrampen zwischen -100 mV und + 100 mV über eine Dauer von 1000 ms.

Nach Tiefpassfilterung (-3 dB, 1000 Hz) wurden die Messdaten des Patch-Experiments mit einem Analog-Digital-Wandler in digitale Zeichen umkodiert, mit dem Computer erfasst und auf Computerfestplatten gespeichert.

### 2.4.9 Datenauswertung

Die Auswertung der gespeicherten Daten erfolgte mit dem Programm *Pulse/ Pulsefit* (Heka Elektronik, Lambrecht/ Pfalz, Deutschland).

Für die Ermittlung der Stromstärke wurden die Strom-Spannungskurven in einem Koordinatensystem aufgetragen, so dass den angelegten Klemmpotentialen die gemessenen Stromwerte direkt zugeordnet werden konnten.

Mit Hilfe der gleichzeitig bestimmten Zellkapazität als Maß für die Zellgröße konnte aus dem Strom-Kapazitätsquotienten der Strom pro Flächeneinheit bestimmt und somit indirekt auf die Zellgröße normiert werden. Hierbei ging man davon aus, dass zwischen der Kapazität und der Fläche der Membran ein proportionales Verhältnis besteht und die Membrankapazität  $1 \text{ pF}/\mu\text{m}^2$  beträgt (Numberger und Draguhn, 1996).

## 2.5 Statistik

Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SE) angegeben.

Die Anzahl der Versuche ist mit **n** bezeichnet.

Der *Wilcoxon-Rank Sum Test* wurde verwendet, um zu prüfen, ob die Mittelwerte x und y von zwei verschiedenen Stichproben X und Y signifikant voneinander verschieden waren.

Mit diesem nichtparametrischen Rangtest konnten vor allem Stichproben mit zahlenmäßig kleinem Umfang verglichen werden. Sofern ein Signifikanzniveau von  $P < 0,05$  erreicht wurde, wurde ein Testergebnis als signifikant betrachtet und in den graphischen Darstellungen durch \* kenntlich gemacht. Bei einem P-Wert von  $< 0,001$  (\*\*\*) galt ein Resultat als statistisch hochsignifikant unterschiedlich vom Vergleichswert.

Mit Hilfe des  $\chi^2$ -Unabhängigkeitstests wurde beurteilt, inwieweit die Häufigkeit eines aufgetretenen Merkmals in zwei verschiedenen Populationen statistisch unterschiedlich war. Gleichzeitig wurde auf diese Weise geprüft, ob ein Zusammenhang zwischen der Merkmalshäufigkeit und der Zugehörigkeit zu einer bestimmten Population besteht.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Elektrophysiologische Charakterisierung von Kaliumkanälen in Lymphozyten

Zunächst wurden  $K^+$ -Kanäle in der Zellmembran von humanen Lymphozyten gesunder Probanden (n=14) mittels Ganzzellstromexperimenten elektrophysiologisch identifiziert und charakterisiert. Eine Aktivierung der Kv-Kanäle erfolgte über Spannungsrampen von -100 bis 100 mV in einer Frequenz von 30/min. Eine Aktivierung kalziumabhängiger Kaliumkanäle wurde durch Zelldialyse mit einer Pipettenlösung mit einer freien Calciumkonzentration  $[Ca^{2+}]_{\text{frei}}$  von 3,0  $\mu\text{M}$  induziert.

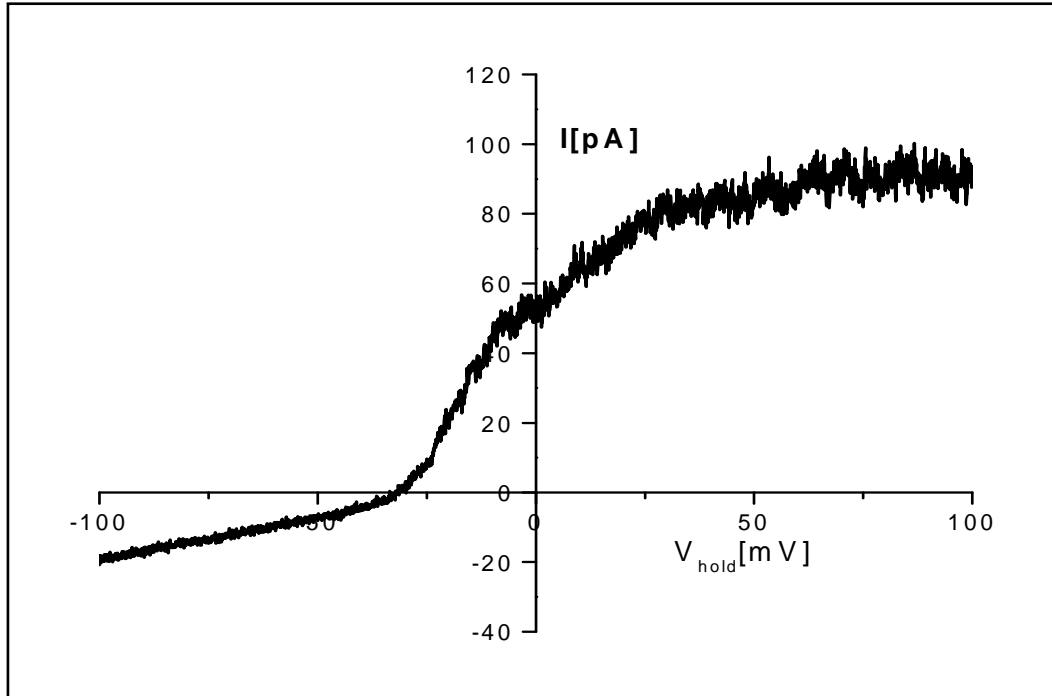
Die Messung der Stromstärke erfolgte an zwei Messpunkten. Bei -40 mV ist der in ruhenden Lymphozyten dominierende Kaliumkanal, der spannungsabhängig öffnende Kaliumkanal Kv noch nicht aktiv, so dass ein an diesem Messpunkt detektierter Kaliumstrom durch einen weiteren Kaliumkanal hervorgerufen sein muss. Daher können hier kalziumabhängige Kaliumkanäle isoliert identifiziert werden. Deswegen werden im Folgenden die -40 mV Messwerte immer auf einen  $K_{Ca}$ -Kanal bezogen.

Der spannungsabhängige Kaliumkanal ist an Lymphozyten nicht bei einem bestimmten Zellpotential alleine aktiv. Im vorliegenden Projekt wurde dieser Kanal deshalb bei 0 mV gemessen. Bei diesem noch physiologischen Zellpotential wird der Zellstrom in unstimulierten Zellen nur vom Kv-Kanal getragen. Bei stimulierten Lymphozyten sind bei 0 mV sowohl kalziumabhängige als auch spannungsabhängige Kanäle aktiv. Durch spezifische Kanalblockersubstanzen kann dann jedoch der kalziumabhängige Stromanteil blockiert und so eine Aussage nur über den Kv-Kanal getroffen werden. Zusammenfassend dienen der Messwert bei -40 mV der isolierten Untersuchung der  $K_{Ca}$ -Kanäle und der Messwert bei 0 mV der Untersuchung von Kv- und  $K_{Ca}$ -Kanälen.

### 3.2 $K^+$ -Kanalfunktion in nicht stimulierten Lymphozyten gesunder Probanden

Die Kapazität der untersuchten Zellen (n=14) betrug hierbei  $2,07 \pm 0,23$  pF. Der vorherrschende Kaliumausstrom in nicht stimulierten T-Lymphozyten konnte anhand seiner typischen Spannungssensitivität elektrophysiologisch als ein Kaliumstrom vom Kv-Typ identifiziert werden. Während bei negativen Membranpotentialen im Bereich von -89 mV bis -35 mV kein  $K^+$ -Auswärtsstrom beobachtet wurde, nahm der  $K^+$ -Strom

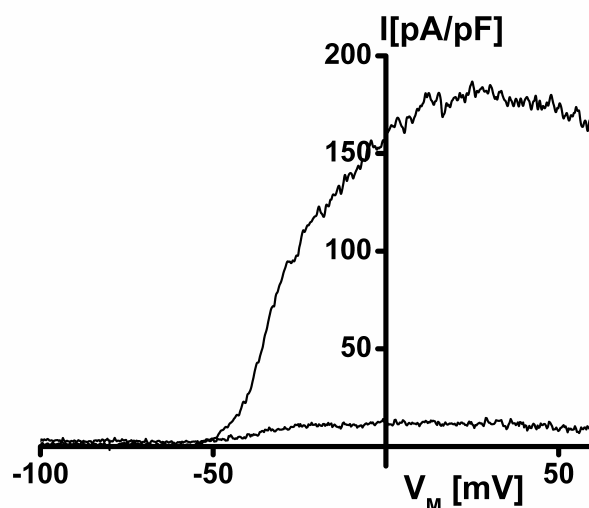
mit schrittweiser Depolarisation deutlich zu. Bei einem Haltepotential von 0 mV betrug der  $K^+$ -Auswärtsstrom  $38 \pm 8$  pA/pF und erreichte bei einem Haltepotential von 100 mV einen Wert von  $68 \pm 14$  pA/pF. Dabei war vor allem im Spannungsintervall von -35 mV bis 0 mV eine signifikante Zunahme des Stroms zu verzeichnen. (Abb.6).



**Abbildung 6: Exemplarische Stromaufzeichnung der  $K^+$ -Ganzellströme bei nicht kompensiertem basalem Hintergrundstrom eines nicht-aktivierten T-Lymphozyten aus dem peripherem Blut eines gesunden Probanden.**

Ferner konnte der Kanal anhand seines charakteristischen Verhaltens gegenüber dem selektiven Kv-Blocker ShK-Dap<sup>22</sup> pharmakologisch identifiziert werden (Kalman et al 1998).

Das an einer Aminosäure veränderte aus der Seeanemone *Stichodactyla helianthus* gewonnene Polypeptid reduzierte in einer Konzentration von 1 nmol/l den  $K^+$ -Strom, gemessen bei einem Membranpotential von 0 mV, um 90 % (n=4). Die Abbildung 7 zeigt beispielhaft die Inhibition des Kv-Stroms durch ShK-Dap<sup>22</sup>.



**Abbildung 7: Reduktion der Stromstärke durch Shk-Dap<sup>22</sup> gemessen bei einem Haltepotential von 0 mV (Konzentration Shk-Dap<sup>22</sup> 1 nmol/l)**

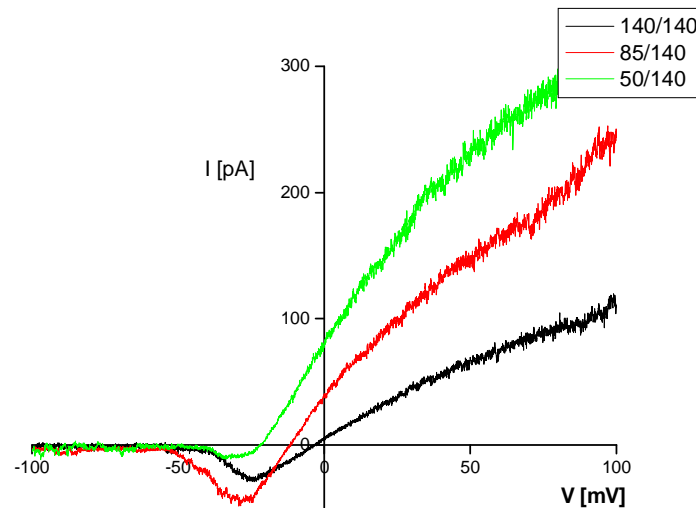
In einer weiteren Untersuchung wurde der Kanal auf seine Ionenselektivität untersucht. Die bei einem K<sup>+</sup>-selektiven Ionenkanal aufgrund der Nernst'schen Gleichung

$$V_m = 58,5 \times \log(x/140),$$

wobei  $V_m$  dem Membranpotential und  $x$  der K<sup>+</sup>-Konzentration in mM entspricht, zu erwartenden Werte sowie die gemessenen Umkehrpotentiale sind in der folgenden Tabelle gegenübergestellt.

**Tabelle 2: K<sup>+</sup>-Selektivität der Kationenauswärtsströme in ruhenden T-Zellen**

extrazelluläre K <sup>+</sup> - Konzentration in mM	zu erwartendes Umkehrpotential ( $V_m$ ) für einen K <sup>+</sup> -selektiven Strom nach Nernst	Mittleres gemessenes Umkehrpotential ( $V_m$ ) (n=3)
50	-26 mV	-22 ± 3 mV
85	-13 mV	-13 ± 2 mV
140	0 mV	-2 ± 2 mV



**Abbildung 8: Kaliumselektivität der Kationenauswärtsströme in ruhenden T-Lymphozyten**

In 22% der untersuchten nicht stimulierten Lymphozyten (3/14) trug eine weitere Komponente zum Kaliumausstrom bei. Anhand ihrer Kalziumabhängigkeit und des typischen Öffnungsverhaltens gegenüber dem spezifischen  $IK_{Ca}$ -Blocker TRAM-34 wurde dieser Kanal als  $IK_{Ca}$  identifiziert. Im folgenden Absatz wird näher auf die Ergebnisse hinsichtlich der Identifizierung des  $IK_{Ca}$  eingegangen.

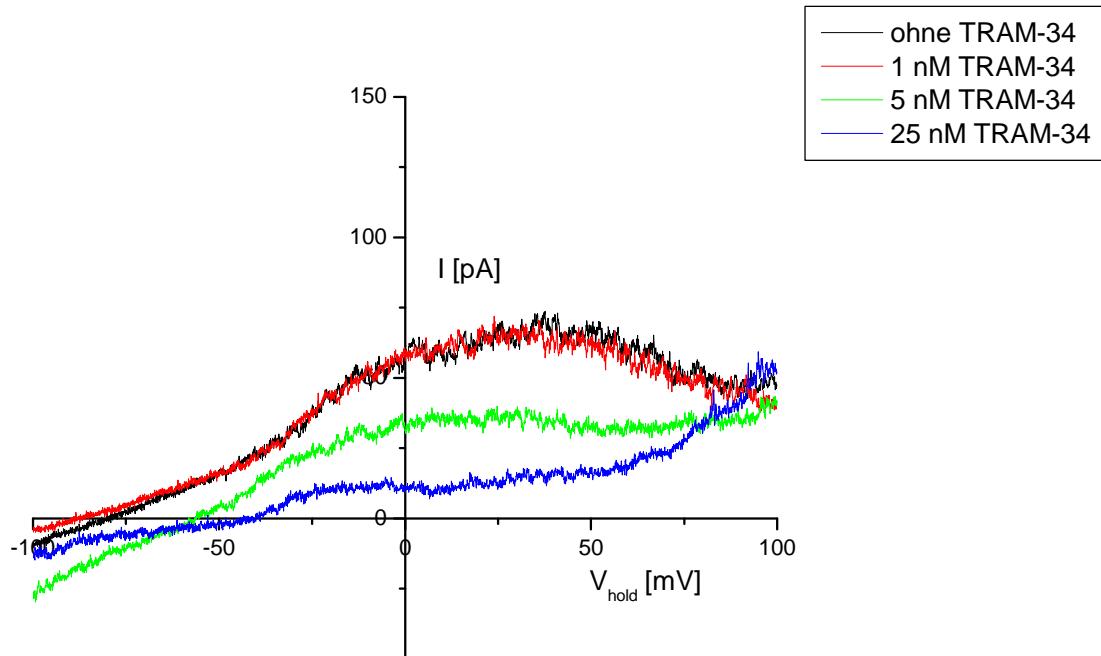
### 3.3 $K^+$ -Kanalfunktion in *in vitro* mit $OKT_3$ -aktivierten T-Lymphozyten

Lymphozyten gesunder Probanden (n=7) wurden entsprechend Standardprotokollen zur T-Zell-Aktivierung durch den Antikörper  $OKT_3$  in einer Konzentration von 500 ng/ml *in vitro* aktiviert (Van Wauwe et al., 1980). Die FACS-Analyse ergab einen Anteil von 74,54% sowohl CD3- als auch CD25-positiver, d.h. erfolgreich aktivierter T-Lymphozyten (n=7). Der Anteil aktivierter T-Lymphozyten in der Kontrollgruppe ohne  $OKT_3$ -Stimulation betrug 1,09% (n=7).

Im Vergleich zu den Untersuchungen an ruhenden Lymphozyten konnte in aktivierten Zellen in 87% der Zellen neben  $K_v$ -Strömen ein kalziumaktiverter  $K^+$ -Kanalstrom, der nicht spannungsabhängig war, nachgewiesen werden. Mittels Inhibition durch den selektiven  $IK_{Ca}$ -Blocker TRAM-34, ein Clotrimazol-Analogon, konnte der Kanal als  $IK_{Ca}$  identifiziert werden. Bei einem Membranpotential von -40 mV, bei dem  $K_v$ -Ströme nicht aktiv sind, reduzierte TRAM-34 (25 nM) den  $Ca^{2+}$ -aktivierten und nicht



spannungsabhängigen  $K^+$ -Strom vollständig. Die Abbildung 9 zeigt exemplarische Stromaufzeichnungen und die dosisabhängige Inhibition des  $IK_{Ca}$ -Stroms durch TRAM-34.

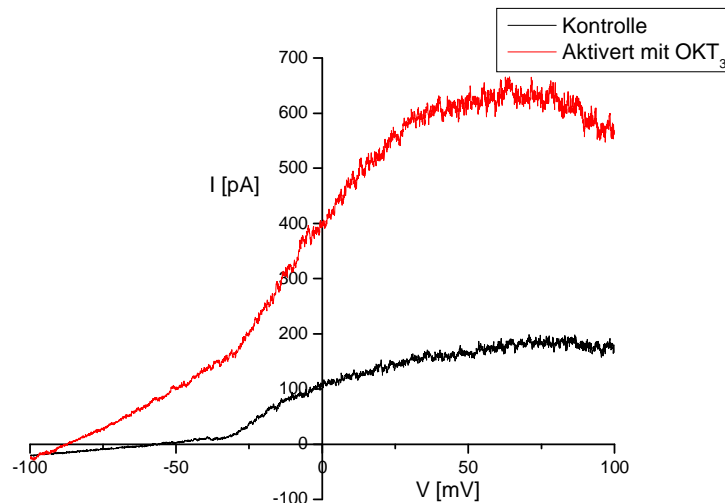


**Abbildung 9: Dosisabhängige Reduktion der Stromstärke durch TRAM-34 gemessen bei einem Haltepotential von -40 mV**

Die Zellkapazität, ein Maß für die Zellgröße, betrug  $2,07 \pm 0,23$  pF bei ruhenden T-Lymphozyten gesunder Probanden. Im Gegensatz dazu war die Zellkapazität OKT<sub>3</sub>-aktivierter Lymphozyten mit  $4,0 \pm 0,7$  pF signifikant erhöht ( $p < 0,05$ , Student-t-Test). Im Vergleich zu ruhenden T-Zellen war der  $IK_{Ca}$ -medierte  $K^+$ -Auswärtsstrom bei einem Haltepotential von -40 mV in den aktivierten T-Lymphozyten ebenfalls hochsignifikant mit  $31 \pm 8$  pA/pF vs.  $1 \pm 1$  pA/pF in ruhenden T-Lymphozyten erhöht ( $p < 0,001$ , Student-t-Test).

Auch bei einem Haltepotential von 0 mV konnte ein signifikant größerer Strom von  $38 \pm 8$  pA/pF in ruhenden T-Lymphozyten vs.  $127 \pm 24$  pA/pF in aktivierten T-Lymphozyten nachgewiesen werden ( $p < 0,01$ , Student-t-Test).

Somit sind in aktivierten Lymphozyten sowohl Kv- als auch  $IK_{Ca}$ -Kanäle nachweisbar. Exemplarisch werden zwei Stromkurven in Abbildung 10 dargestellt.



**Abbildung 10: Exemplarische Darstellung der  $K^+$ -Ganzzellströme von T-Lymphozyten eines gesunden Probanden nativ sowie nach Aktivierung durch  $OKT_3$**

### 3.4 $K^+$ -Kanalfunktion in Lymphozyten von Patienten nach Nierentransplantation

#### 3.4.1 Patientendaten

Bei 46 Patienten, die im Zeitraum von November 2001 bis Oktober 2002 eine Nierentransplantation erhielten, wurde die T-lymphozytäre  $K^+$ -Kanalfunktion vor und nach der Operation über einen Zeitraum von 21 Tagen postoperativ im Verlauf des stationären Aufenthalts bestimmt. Zusätzlich wurden noch die 5 Patienten eingeschlossen, die während des Zeitraums aufgrund einer akuten Transplantatrejektion in stationärer Behandlung waren.

Dabei wurde zur Datenanalyse folgendermaßen vorgegangen: Pro Patient wurde zu jedem Untersuchungszeitpunkt der Mittelwert aus 5-8 Einzelmessungen ermittelt und für die Berechnung verwendet. Bei den nachfolgenden Abbildungen 11-13, 14-16 sowie 18-20 werden die Mittelwerte der Messungen einer Patientengruppe dargestellt. Abweichungen von der Gesamtzahl der Patienten pro Gruppe ergeben sich, wenn zu einem bestimmten Untersuchungszeitpunkt nicht von jedem Patienten Material zur Verfügung stand.

Die  $K^+$ -Kanalfunktionen der T-Lymphozyten der Patienten wurden präoperativ sowie an den Tagen 1, 3, 7, 14 und 21 postOP elektrophysiologisch untersucht. Unmittelbar

bei klinischem Verdacht auf Rejektion erfolgten ebenfalls elektrophysiologische Untersuchungen. Wurde die klinische Verdachtsdiagnose durch eine Transplantatbiopsie histologisch bestätigt, erfolgten weitere elektrophysiologische Messungen am 2., 6. und 12. Tag nach Diagnosestellung.

Das Patientenkollektiv unterteilte sich in ein Kollektiv mit akuter Nierentransplantatrejektion und in ein Kollektiv ohne Transplantatrejektion. Die klinischen Daten der Patienten sind in der Tabelle zusammengefasst. Die beiden Gruppen wiesen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Alters des Empfängers oder Spenders, des Geschlecht des Empfängers, der kalten Ischämiezeit, der warmen Ischämiezeit sowie der Anzahl von HLA-*mismatches* auf.

**Tabelle 3: Klinische Daten der Patientenkollektive; <sup>1</sup>  $\chi^2$ -Test <sup>2</sup> Student-t-Test**

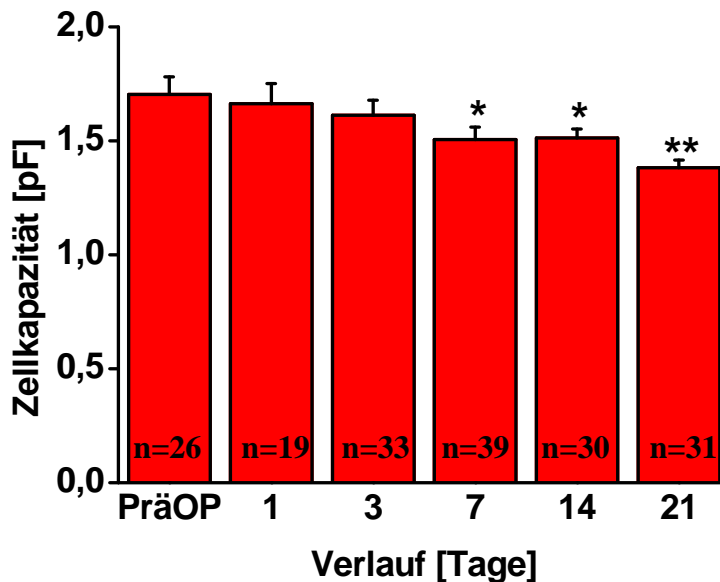
	Rejektion	Keine Rejektion	p
Patienten (n=)	11	40	
m / w	7/4	23/17	0,98 <sup>1</sup>
Alter Empfänger (J)	53,5 ± 3,7	50,1 ± 1,8	0,39 <sup>2</sup>
Alter Spender (J)	57,2 ± 4,3	50,1 ± 2,7	0,21 <sup>2</sup>
HLA- <i>mismatches</i>	3,0 ± 0,4	2,4 ± 0,3	0,23 <sup>2</sup>
Kalte Ischämie (h)	14,6 ± 1,5	14,5 ± 1,0	0,95 <sup>2</sup>
Warme Ischämie (min)	41,3 ± 5,1	43,6 ± 2,5	0,68 <sup>2</sup>
Therapie	CsA/Predni/MMF	CsA/Predni/MMF	

### 3.4.2 K<sup>+</sup>-Kanalfunktion bei Patienten ohne akute Transplantatrejektion

Patienten ohne akute Transplantatrejektion zeigten postoperativ eine gute Nierenfunktion mit stabilen Kreatininwerten. Bei drei der insgesamt 40 Patienten bestand während des Beobachtungszeitraums der Verdacht auf akute Transplantatrejektion, der jedoch aufgrund eines negativen Biopsiebefunds nicht bestätigt werden konnte.

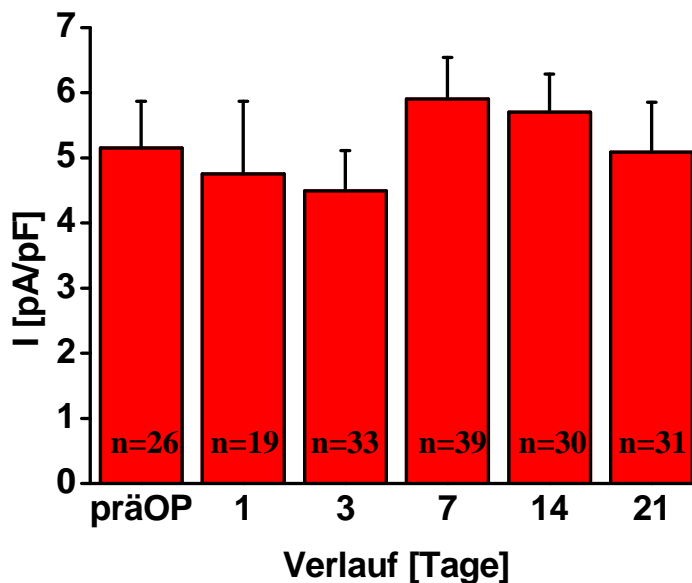
Präoperativ betrug der K<sup>+</sup>-Auswärtsstrom in den untersuchten T-Lymphozyten 53 ± 4 pA/pF bei einem Haltepotential von 0 mV und 5 ± 1 pA/pF bei -40 mV. Die mittlere Zellkapazität betrug 1,7 ± 0,1 pF.

An den folgenden Untersuchungstagen 1 und 3 betrug die Kapazität  $1,7 \pm 0,1$  pF bzw.  $1,6 \pm 0,1$  pF. Mit einer Zellkapazität von  $1,5 \pm 0,1$  pF an Tag 7 ( $p < 0,05$ , Student-t-Test),  $1,5 \pm 0,1$  pF an Tag 14 ( $p < 0,05$ , Student-t-Test) sowie  $1,4 \pm 0,1$  pF an Tag 21 ( $p < 0,0001$ , Student-t-Test) fanden sich im Vergleich zum präoperativen Wert im Verlauf signifikant niedrigere Werte (Abb.11).



**Abbildung 11: Darstellung der mittleren Zellkapazität der Patienten ohne akute Transplantatrejektion im postoperativen Verlauf. Pro Patient wurde der Mittelwert aus 5-8 Messungen ermittelt. Die n-Zahlen geben die Anzahl der Patienten am entsprechenden Untersuchungszeitpunkt an. Abweichungen der Patientenanzahl ergeben sich, wenn zu einem bestimmten Untersuchungszeitpunkt nicht von jedem Patienten Material zur Verfügung stand. Die Datenpunkte entsprechen Mittelwerten  $\pm$  Standardfehler (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,0001$  Student-t-Test).**

Im postoperativen Verlauf dieser Gruppe konnte bei Haltepotentialen von  $-40$  mV kein signifikanter Unterschied der  $K^+$ -Auswärtsströme detektiert werden. Der Strom betrug an Tag 1, 3, 7, 14 bzw. 21 jeweils  $5 \pm 1$  pA/pF,  $4 \pm 1$  pA/pF,  $6 \pm 1$  pA/pF,  $6 \pm 1$  pA/pF bzw.  $5 \pm 1$  pA/pF (Abb.12).



**Abbildung 12:** Darstellung der T-lymphozytären  $K^+$ -Auswärtsströme bei Patienten ohne akute Transplantatrejektion im postoperativen Verlauf bei einem Haltepotential von -40 mV. Die n-Zahlen geben die Anzahl der Patienten am entsprechenden Untersuchungszeitpunkt an. Die Datenpunkte entsprechen Mittelwerten  $\pm$  Standardfehler.

Im Gegensatz dazu konnte bei einem Haltepotential von 0 mV eine signifikante Zunahme des Stroms nachgewiesen werden. Im Vergleich zu einem präoperativen Wert von  $53 \pm 4$  pA/pF betrug die mittlere Stromstärke am 1. postoperativen Tag  $52 \pm 5$  pA/pF, am 3. Tag  $56 \pm 4$  pA/pF, am 7. Tag  $70 \pm 5$  pA/pF ( $p < 0,05$ , Student-t-Test), am 14. Tag  $83 \pm 6$  pA/pF ( $p < 0,0001$ , Student-t-Test) sowie am 21. Tag  $92 \pm 7$  pA/pF ( $p < 0,0001$ , Student-t-Test) (Abb.13).

Abbildung 14 zeigt exemplarisch zwei Stromkurven eines Patienten präoperativ und im postoperativen Verlauf.

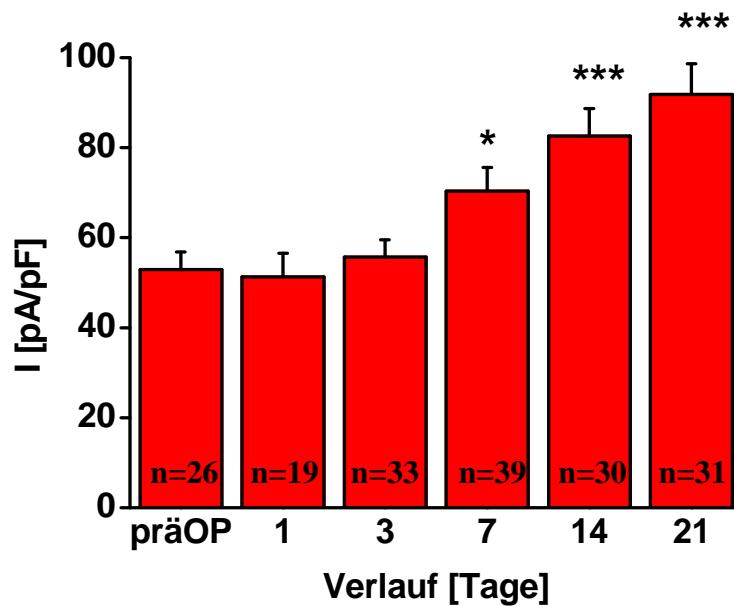


Abbildung 13: Darstellung der T-lymphozytären  $K^+$ -Auswärtsströme der Patienten ohne akute Transplantatrejektion im postoperativen Verlauf bei einem Haltepotential von 0 mV. Die n-Zahlen geben die Anzahl der Patienten am entsprechenden Untersuchungszeitpunkt an. Die Datenpunkte entsprechen Mittelwerten  $\pm$  Standardfehler (\*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,0001$  Student-t-Test).

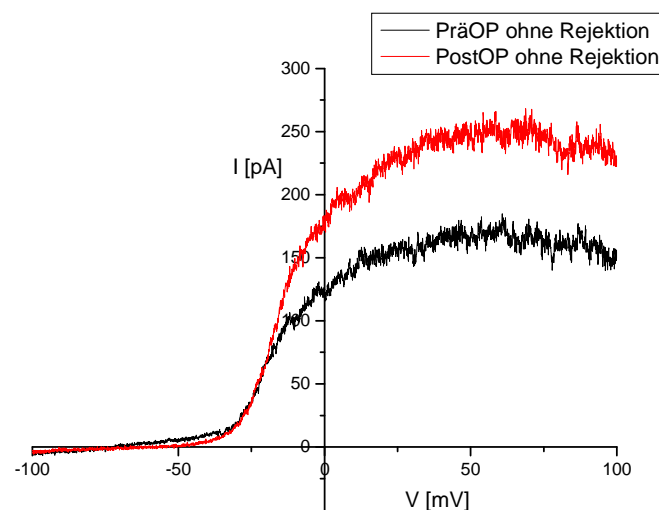


Abbildung 14: Exemplarische Darstellung der  $K^+$ -Ganzzellströme von T-Lymphozyten eines Patienten präoperativ und am 7. Tag nach Transplantation ohne akute Transplantatrejektion.

### 3.4.3 Verlauf bei Patienten mit akuter Transplantatabstoßung

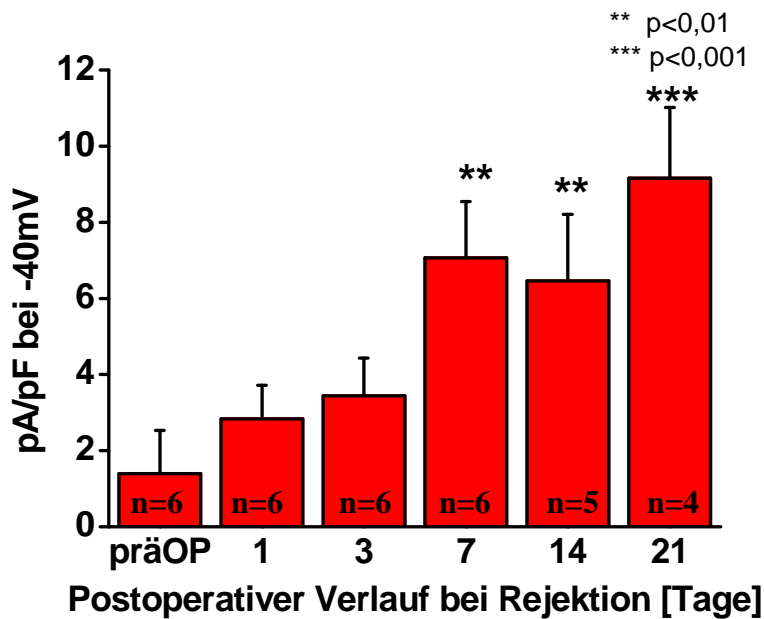
Bei klinischem Verdacht auf akute Transplantatrejektion, d.h. bei Verschlechterung der Nierenfunktion mit einem Anstieg des Serumkreatinins bzw. einem Rückgang der Diurese wurde eine Nierenbiopsie durchgeführt. Bei histologisch bestätigter Rejektion (n=11) wurde eine Abstoßungstherapie mit Prednisolon eingeleitet. Der Median des Tages der Diagnose der Rejektion und gleichzeitig des Beginns der Prednisolon-Bolus-Therapie war Tag 24 nach Transplantation. Jedoch wies der Zeitpunkt der Rejektion große Variationen auf, mit frühen Rejektionen am 6. postoperativen Tag und etwas später auftretenden Rejektionen bis zum 28. postoperativen Tag.

In den elektrophysiologischen Untersuchungen wurde präoperativ eine Zellkapazität von  $1,5 \pm 0,5$  pF bestimmt. Bei einem Haltepotential von -40 mV wurde eine Stromstärke von  $2 \pm 1$  pA/pF gemessen. Die Stromstärke der T-lymphozytären  $K^+$ -Auswärtsströme bei einem Haltepotential von 0 mV betrug präoperativ  $50 \pm 7$  pA/pF.

Die Zellkapazität der Lymphozyten blieb bis zum Zeitpunkt der Rejektion konstant. Die mittlere Zellkapazität an den Tagen 1, 3, 7, 14 und 21 betrug  $1,5 \pm 0,1$  pF,  $1,5 \pm 0,1$  pF,  $1,6 \pm 0,1$  pF,  $1,4 \pm 0,1$  pF,  $1,5 \pm 0,1$  pF sowie  $1,5 \pm 0,1$  pF.

Auch bei einem Haltepotential von 0 mV konnten in dieser Gruppe im Gegensatz zu der Gruppe ohne Rejektion im postoperativen Verlauf keine signifikanten Veränderungen der Stromstärke beobachtet werden. Die ermittelten Werte betrugen  $50 \pm 7$  pA/pF,  $42 \pm 7$  pA/pF,  $60 \pm 7$  pA/pF,  $70 \pm 7$  pA/pF,  $52 \pm 6$  pA/pF sowie  $64 \pm 6$  pA/pF jeweils an den Tagen 1, 3, 7, 14 sowie 21 nach Transplantation.

Im Gegensatz dazu konnte bei einem Haltepotential von -40 mV im postoperativen Verlauf ein stetiger Anstieg der Stromstärke nachgewiesen werden. Während die am 1. und 3. postoperativ bestimmten Werte noch keine Veränderung anzeigten (jeweils  $3 \pm 1$  pA/pF) stieg die Stromstärke ab dem 7. postoperativen Tag an. Die Werte am 7., 14. sowie 21. Tag nach Transplantation betrugen  $7 \pm 1$  pA/pF ( $p < 0,01$ , Student-t-Test),  $6 \pm 2$  pA/pF ( $p < 0,01$  Student-t-Test) sowie  $9 \pm 2$  pA/pF ( $p < 0,001$ , Student-t-Test) (Abb.15).



**Abbildung 15:** Darstellung der T-lymphozytären  $K^+$ -Auswärtsströme der Patienten mit akuter Transplantatrejektion im postoperativen Verlauf bei einem Haltepotential von -40 mV. Die n-Zahlen geben die Anzahl der Patienten am entsprechenden Untersuchungszeitpunkt an. Die Datenpunkte entsprechen Mittelwerten  $\pm$  Standardfehler (\*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 Student-t-Test).

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung der Rejektion konnte bei allen Patienten sowohl bei einem Haltepotential von -40 mV ( $12 \pm 1$  pA/pF, p<0,001 Student-t-Test) als auch bei einem Potential von 0 mV ( $80 \pm 5$  pA/pF, p<0,001, Student-t-Test) eine hochsignifikante Zunahme der Stromstärke im Vergleich zu den präoperativ bestimmten Werten nachgewiesen werden (Abb. 16-18).



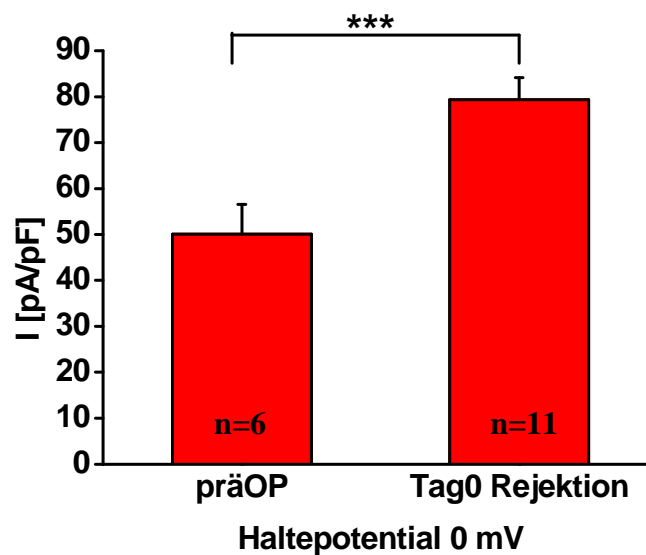
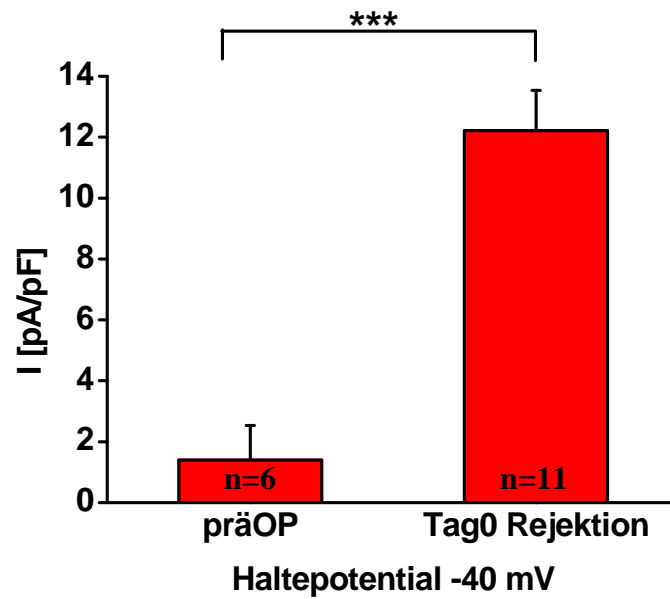
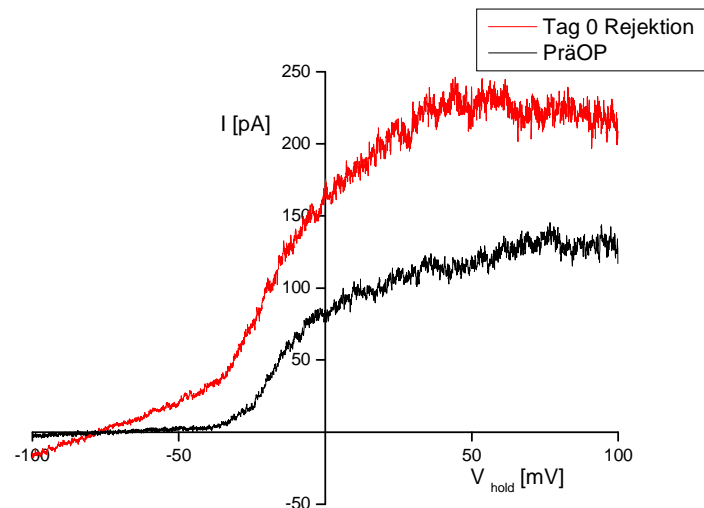


Abbildung 16 und Abbildung 17: Darstellung der T-lymphozytären  $K^+$ -Auswärtsströme der Patienten mit akuter Transplantatrejektion vergleichend vor Transplantation sowie am Tag der Diagnosestellung der akuten Rejektion bei einem Haltepotential von -40 mV sowie 0 mV. Die n-Zahlen geben die Anzahl der Patienten am entsprechenden Untersuchungszeitpunkt an. Die Datenpunkte entsprechen Mittelwerten  $\pm$  Standardfehler (\*\*\* p<0,001 Student-t-Test).



**Abbildung 18: Exemplarische Darstellung der  $K^+$ -Ganzzellströme von Lymphozyten eines Patienten präoperativ und zum Zeitpunkt der Diagnosestellung der akuten Rejektion.**

Aufgrund des sehr unterschiedlichen zeitlichen Verlaufs der akuten Transplantatrejektion der einzelnen Patienten sind die T-lymphozytären Kaliumauswärtsströme jedes einzelnen Patienten mit akuter Transplantatrejektion im postoperativen Verlauf im Anhang dargestellt.

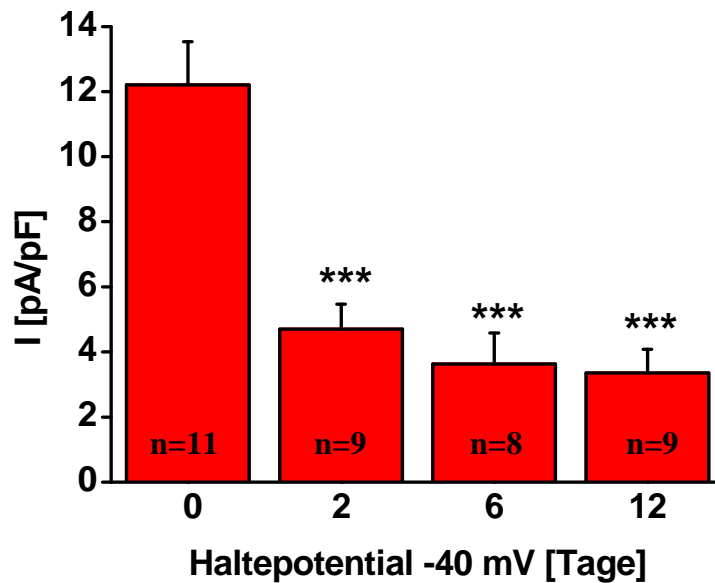
Unter der Rejektionstherapie stabilisierte sich bei 10 von 11 Patienten die Nierenfunktion. Einem Patienten musste bei einer trotz wochenlanger intensivierter Rejektionstherapie nicht beherrschbaren akuten vaskulären Rejektion und zusätzlicher bakterieller Infektion das Transplantat entfernt werden. Aufgrund des stark abweichenden klinischen Verlaufs der Transplantation wurden die Daten dieses Patienten in die weiteren Auswertungen nicht mehr eingeschlossen. Die Stromwerte aus der ersten Phase der Rejektion entsprechen vollständig denen der anderen Patienten mit Rejektion. Der nachfolgende komplizierte Verlauf mit zusätzlicher schwerer Transplantatinfektion führt dann zu einer vollständig anderen Regulation der lymphozytären Zellströme, so dass diese Patientendaten nicht in die Gesamtauswertung eingehen. Sie werden gesondert in Abbildung 21 dargestellt.

In den elektrophysiologischen Messungen der verbliebenen 10 Patienten wurde sowohl bei einem Haltepotential von -40 mV als auch bei 0 mV unter erfolgreicher Therapie (n=10) ein signifikanter Abfall der Stromstärke beobachtet.

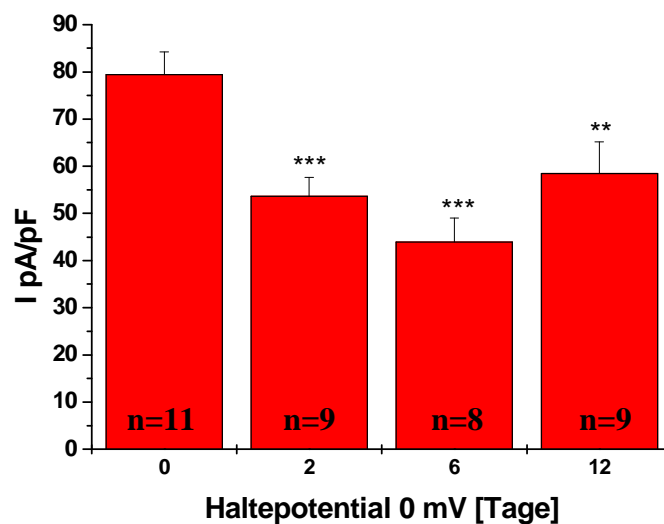
Gemessen bei einem Haltepotential von -40 mV reduzierte sich die Stromstärke von  $12 \pm 1$  pA/pF am Tag der Diagnosestellung der Rejektion auf  $5 \pm 1$  pA/pF ( $p < 0,001$ , Student-t-Test),  $4 \pm 1$  pA/pF ( $p < 0,001$ , Student-t-Test) und  $3 \pm 1$  pA/pF ( $p < 0,001$ , Student-t-Test) entsprechend an den Tagen 2, 6 sowie 12 nach Diagnosestellung.

Auch bei einem Haltepotential von 0 mV wurde eine Abnahme der Stromstärke unter erfolgreicher Therapie festgestellt. Ausgehend von  $80 \pm 5$  pA/pF reduzierte sich die Stromstärke an den Tagen 2, 6 sowie 12 nach Therapiebeginn auf  $54 \pm 4$  pA/pF ( $p < 0,001$ , Student-t-Test),  $46 \pm 5$  pA/pF ( $p < 0,001$ , Student-t-Test) und  $58 \pm 7$  pA/pF ( $p < 0,01$ , Student-t-Test).

Abbildung 18 und 19 stellen den Verlauf unter Therapie unter Einschluss aller stabilisierten Patienten (n=10) bei einem Haltepotential von -40 mV bzw. 0 mV dar.

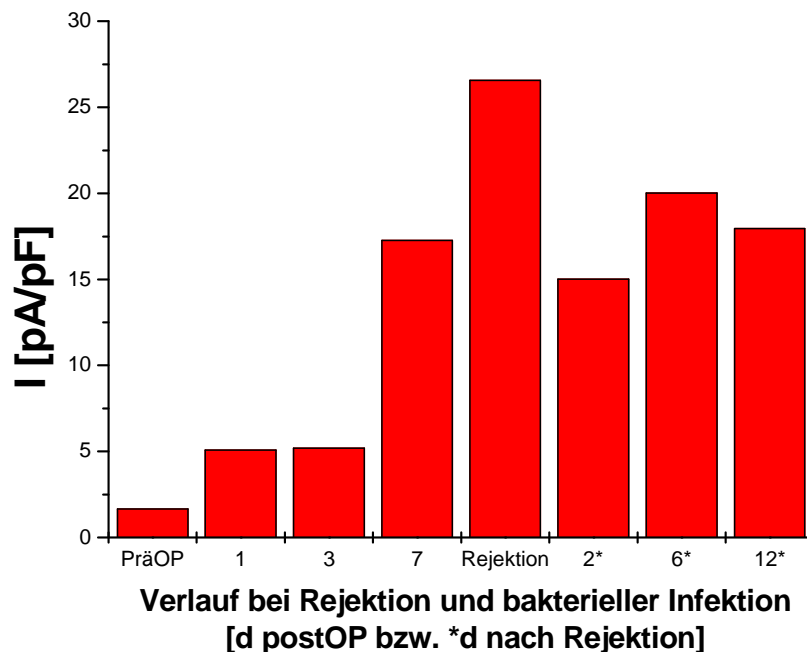


**Abbildung 19:** Darstellung der T-lymphozytären  $K^+$ -Auswärtsströme bei Patienten mit akuter Transplantatrejektion unter Rejektionstherapie bei einem Haltepotential von -40 mV jeweils am Tag der Diagnosestellung der akuten Rejektion (Tag 0) sowie am Tag 2, 6 und 12 nach Diagnosestellung. Die n-Zahlen geben die Anzahl der Patienten am entsprechenden Untersuchungszeitpunkt an. Die Datenpunkte entsprechen Mittelwerten  $\pm$  Standardfehler (\*\*\*  $p < 0,001$  Student-t-Test).



**Abbildung 20:** Darstellung der T-lymphozytären  $K^+$ -Auswärtsströme bei Patienten mit akuter Transplantatrejektion unter Rejektionstherapie bei einem Haltepotential von 0 mV jeweils am Tag der Diagnosestellung der akuten Rejektion (Tag 0) sowie am Tag 2, 6 und 12 nach Diagnosestellung. Die n-Zahlen geben die Anzahl der Patienten am entsprechenden Untersuchungszeitpunkt an. Die Datenpunkte entsprechen Mittelwerten  $\pm$  Standardfehler (\*\*  $p < 0,01$  Student-t-Test, \*\*\*  $p < 0,001$  Student-t-Test).

Sowohl bei einem Haltepotential von -40 mV als auch bei 0 mV fand sich nach erfolgreicher Therapie (Tag 12) kein signifikanter Unterschied zu den präoperativ bestimmten Werten dieser Gruppe.



**Abbildung 21:** Darstellung der T-lymphozytären  $K^+$ -Auswärtsströme bei -40 mV bei einem Patienten mit akuter Transplantatrejektion sowie zusätzlicher schwerer bakterieller Infektion.

#### 3.4.4 Vergleich der Patientengruppen

Präoperativ fand sich bei einem Haltepotential von -40 mV in der Gruppe mit akuter Transplantatrejektion im Verlauf eine signifikant niedrigere Stromstärke ( $5 \pm 1$  pA/pF vs.  $2 \pm 1$  pA/pF). Dies ist in Bezug auf die Gruppe ohne Rejektion ein geringer numerischer Unterschied, jedoch ein signifikant niedrigerer präoperativer Wert ( $p < 0,01$ , Student-t-Test).

Bei einem Haltepotential von 0 mV sowie bezüglich der Zellgröße fand sich im Vergleich der präoperativen Werte kein Unterschied.

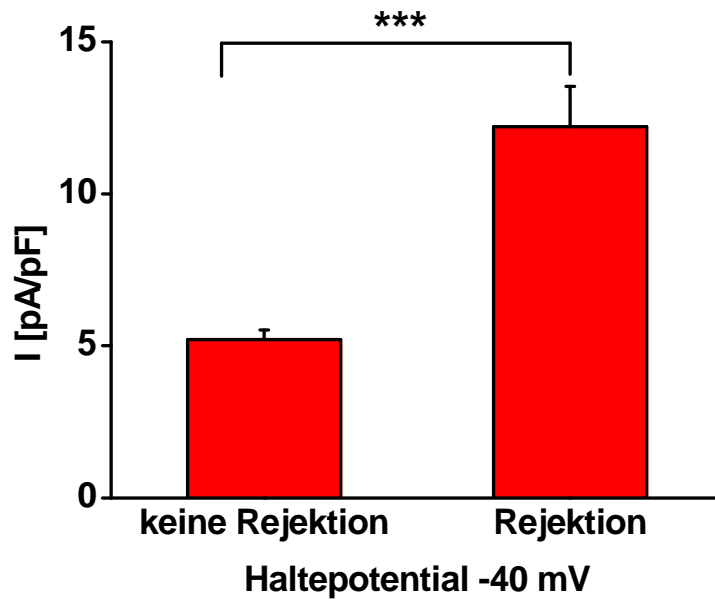
Am 1., 3., und 7. postoperativen Tag konnte bei keinem der genannten Parameter ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Am 14. Tag wurde bei einem Haltepotential von 0 mV in der Patientengruppe ohne Rejektion eine signifikant höhere Stromstärke gemessen. Die Stromstärke betrug bei 0 mV in der Patientengruppe ohne Rejektion  $83 \pm 6$  pA/pF und  $52 \pm 5$  pA/pF in der Gruppe mit Rejektion ( $p < 0,05$ , Student-t-Test). Sowohl in Bezug auf die Stromstärke bei -40 mV als auch in Bezug auf die Zellkapazität ergab sich kein signifikanter Unterschied. Die Stromstärke bei -40 mV betrug in der Gruppe ohne Rejektion  $6 \pm 1$  pA/pF, in der Patientengruppe mit Rejektion  $6 \pm 2$  pA/pF. Die Zellkapazität in der Gruppe ohne Rejektion betrug  $1,5 \pm 0,1$  pF.

Am Tag 21 postoperativ konnte bei keinem der untersuchten Parameter ein signifikanter Unterschied gemessen werden. Die Zellkapazität in der Gruppe ohne Rejektion betrug  $1,4 \pm 0,1$  pF, in der Gruppe mit Rejektion  $1,5 \pm 0,1$  pF. Bei 0 mV wurde in der Gruppe ohne Rejektion eine Stromstärke von  $92 \pm 7$  pA/pF, in der Gruppe mit Rejektion von  $64 \pm 6$  pA/pF gemessen ( $p = 0,11$ ).

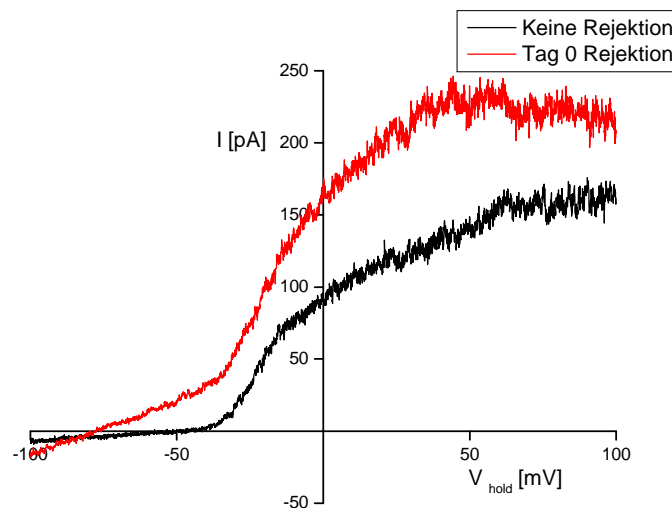
Gemessen bei -40 mV ergab sich in der Gruppe ohne Rejektion eine Stromstärke von  $5 \pm 1$  pA/pF, in der Gruppe mit Rejektion wurde eine Stromstärke von  $9 \pm 2$  gemessen. Diese Werte sind tendenziell unterschiedlich, ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht festgestellt werden ( $p = 0,05$ ).

Am Tag der Rejektion konnte bei einem Membranpotential von -40 mV sowie bezüglich der Zellgröße zwischen beiden Gruppen ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Stromstärke bei -40 mV betrug  $12 \pm 1$  pA/pF in der Gruppe mit Rejektion, ohne Rejektion  $5 \pm 0,3$  pA/pF,  $p < 0,0001$ , Student-t-Test) (Abb. 22). Die Zellgröße wurde in der Gruppe mit Rejektion mit  $1,7 \pm 0,1$  pF und ohne Rejektion mit  $1,5 \pm 0,03$  bestimmt ( $p < 0,05$ , Student-t-Test). Bei einem Haltepotential von 0 mV fand sich kein signifikanter Unterschied ( $80 \pm 5$  pA/pF mit Rejektion vs.  $71 \pm 3$  pA/pF ohne Rejektion).



**Abbildung 22:** Darstellung der T-lymphozytären  $K^+$ -Auswärtsströme von Patienten ohne ( $n=40$ ) und mit ( $n=10$ ) akuter Transplantatrejektion bei einem Haltepotential von  $-40$  mV. Die Datenpunkte entsprechen Mittelwerten  $\pm$  Standardfehler (\*\*\*)  $p < 0,0001$  Student-t-Test).

Die Abbildung 23 zeigt zwei Stromaufzeichnungen im Vergleich.



**Abbildung 23:** Exemplarische Darstellung der  $K^+$ -Ganzzellströme von Lymphozyten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung der akuten Rejektion im Vergleich zu den  $K^+$ -Ganzzellströmen eines Patienten ohne Rejektion.

## 4 Diskussion

Eine wesentliche Komplikation der Nierentransplantation besteht in der akuten Transplantatrejektion. Der exakte Pathomechanismus und auch die genauen Ursachen sind noch nicht eindeutig geklärt. Auch wird die akute Transplantatabstoßung aufgrund fehlender früher Marker erst spät im Verlauf diagnostiziert, nämlich erst wenn ein Anstieg des Serumkreatinins und somit eine Verschlechterung der Nierenfunktion im Einklang mit dem typischen histopathologischen Bild einen wesentlichen Parenchymschaden erkennen lassen.

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand elektrophysiologischer Untersuchungen von T-Lymphozyten nierentransplanterter Patienten gezeigt werden, dass im Verlauf einer akuten Abstoßungsreaktion eine veränderte Zusammensetzung der  $K^+$ -Kanäle als Marker für eine T-lymphozytäre Abstoßung nachweisbar ist. Während ruhende T-Lymphozyten sowie T-Lymphozyten von nierentransplantierten Patienten ohne akute Transplantatrejektion überwiegend spannungsabhängige Kv-Kanäle aufweisen, konnte in T-Lymphozyten nierentransplanterter Patienten mit akuter Transplantatrejektion eine Zunahme der  $IK_{Ca}$ -Funktion festgestellt werden.

Der  $IK_{Ca}$ -Kanal wird in proliferierenden Lymphozyten (Ghanshani et al., 2000) sowie verschiedenen anderen Zelltypen wie z.B. in wachstumsstimulierten Fibroblasten (Peña et al., 2000) und glatten Gefäßmuskelzellen *in vitro* (Köhler et al., 2003; Neylon et al., Circ Res 1999) als ein wichtiger Regulator bei der Mitogenese angesehen. Die Zunahme der  $IK_{Ca}$ -Funktion scheint eine bedeutende Rolle für die Regulation der Proliferation und Aktivierung der Lymphozyten im Rahmen der akuten Transplantatrejektion darzustellen. Somit könnte die  $IK_{Ca}$ -Kanalfunktion als möglicher früher Marker einer akuten Rejektion eingesetzt werden.

Kv-Kanäle gelten als charakteristische  $K^+$ -Kanäle humaner Lymphozyten und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration.

Der in nicht aktivierten humanen Lymphozyten vorherrschende spannungsabhängige Kaliumstrom, der sogenannte „type n“ Strom ist ein langsam inaktivierender Strom der durch Quinin, 4-Aminopyridin und Tetraethylammonium inhibiert werden kann (DeCoursey et al., 1984, 1987; Matteson & Deutsch, 1984; Fukushima et al., 1984; Deutsch et al., 1986). Anfang der 90er Jahre gelang es mehreren Gruppen, den



spannungsabhängigen Kanal Kv 1.3 zu klonieren und nachzuweisen, dass dieses K<sup>+</sup>-Kanal-Gen in humanen Lymphozyten stark exprimiert wird. Sie konnten nachweisen, dass dieser Kanal bezüglich seiner elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften mit *type n* K<sup>+</sup>-Kanälen identisch ist (Grissmer et al., 1990; Douglass et al., 1990; Cai et al., 1992; Attali et al., 1992). Kv 1.3-Kanäle konnten bislang in Lymphozyten unterschiedlicher Spezies einschließlich des Menschen nachgewiesen werden (Bolotina et al., 2000; Nelson & Quayle, 1995). Ferner wurden weitere Kv-Subtypen in zahlreichen anderen Geweben und Zelltypen wie z.B. in neuronalen Zellen (Mathie et al., 1998, Grissmer et al., 1994), in Herzmuskelzellen (Heidbuchel et al., 1990) und in Inselzellen des Pankreas (Herrington et al., 2005; MacDonald et al., 2001) beschrieben.

Die Bedeutung der Kv1.3-Kanäle bei der Aktivierung von Lymphozyten wurde u. a. deutlich, als Beeton et. al. (2001) nachwiesen, dass der selektive Kv1.3 Kanalblocker ShK-Dap<sup>22</sup> Proliferation und IL2-Produktion von stimulierten Lymphozyten verhindert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die selektiven Kv-Blocker Margatoxin und Kaliotoxin Hypersensitivitätsreaktionen des Spättyps verringerten und Symptome der experimentellen Autoimmun-Enzephalitis *in vivo* besserten (Beeton et al., 2001; Koo et al., 1997, 1999). Somit könnte der Kv-Kanal ein mögliches Ziel für die Entwicklung neuer Immunsuppressiva darstellen.

Es wurden bereits erste sowohl sehr wirksame als auch selektive Kv1.3-Blocker entwickelt. Neben ShK-Dap<sup>22</sup> konnten weitere Nicht-Peptid-Analoga wie z.B. WIN 17317-3 (Hill et al., 1995) und bestimmte Alkoxyypsorale (Wulff et al., 1998) identifiziert werden, die Kv-Kanäle blocken und eine Lymphozytenaktivierung *in vitro* verhindern. Auch wenn diese Blockersubstanzen zum Teil noch eine mangelhafte Spezifität und/oder Wirkstärke aufweisen, bilden sie die Grundlage für die Entwicklung neuerer Substanzen, die möglicherweise eine neue Klasse immunsuppressiv wirksamer Medikamente mit einem günstigeren Nebenwirkungsprofil als klassische Immunsuppressiva wie Cyclosporin A oder FK506 darstellen können.

Eine vergleichbare Entwicklung von Blockern der IK<sub>Ca</sub>-Subtypen ist bisher nicht etabliert, lediglich in der Arbeitsgruppe von H. Wulff wurde mit dem Cotrimazol-Analog TRAM-34 ein spezifischer Blocker des IK<sub>Ca</sub> entwickelt (Wulff et al., 2000).

#### 4.1. Charakterisierung T-lymphozytärer Kaliumströme

##### 4.1.1 K<sup>+</sup>-Kanalfunktionsmuster in peripheren Lymphozyten gesunder Probanden

In den vorliegenden Patch-clamp-Untersuchungen konnte der Kv1.3-Kanal in allen frisch isolierten Lymphozyten gesunder Probanden sowohl elektrophysiologisch anhand seiner charakteristischen Spannungsabhängigkeit und seiner pharmakologischen Eigenschaften identifiziert werden.

Die im Rahmen der vorliegenden Studie durchgeführten pharmakologischen Untersuchungen an Lymphozyten gesunder Probanden ergaben, dass der Kv1.3 durch das hochselektive und hochaffine ShK-Dap<sup>22</sup>, einem aus dem Gift der Seeanemone *Stichodactyla helianthus* isolierten Peptids, bei welchem an Position 22 Lysin durch Diaminopropionsäure ersetzt wurde (Kalman et al., 1998; Beeton et al., 2001), inhibiert wurde.

ShK-Dap<sup>22</sup> induzierte dabei im pikomolaren Konzentrationsbereich eine Inhibition des Kv-Stroms, wobei bei einer Konzentration von 1 nM der auswärtsgerichtete K<sup>+</sup>-Strom nahezu vollständig inhibiert wurde. Dieser Wert steht in gutem Einklang mit den in der Literatur zu findenden Angaben (Kalman et al, 1998).

In einem Teil der ruhenden Lymphozyten (3/14) trug ein weiterer K<sup>+</sup>-Kanal zu einem geringen Anteil zum Gesamtstrom bei, der aufgrund seiner Calciumabhängigkeit, seiner Strom-Spannungs-Kennlinie sowie seiner Sensitivität gegenüber dem spezifischen IK<sub>Ca</sub>-Blocker TRAM-34 als IK<sub>Ca</sub>-Kanal identifiziert werden konnte. Die Ergebnisse zu diesem Kanaltyp werden im folgenden Abschnitt eingehend diskutiert.

##### 4.1.2 K<sup>+</sup>-Kanalfunktionsmuster in OKT3-aktivierten Lymphozyten gesunder Probanden

Die *in vitro* Aktivierung der Lymphozyten erfolgte entsprechend Standardprotokollen zur T-Zellstimulation durch den monoklonalen T-Zell-Rezeptor-Antikörper OKT3 (Van Wauwe 1980). Mittels FACS-Analyse konnten in 75% der *in vitro* aktivierten T-Lymphozyten die für aktivierte T-Lymphozyten typischen Oberflächenantigene CD 3 und CD 25 nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte in den elektrophysiologischen Experimenten an aktivierten T-Lymphozyten gezeigt werden, dass das Expressionsmuster  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger  $\text{K}^+$ -Kanäle in proliferierenden Lymphozyten im Vergleich zu nicht aktivierten Zellen wesentlich verändert ist: So wurde bei aktivierten Lymphozyten eine deutlich erhöhte Amplitude des  $\text{K}^+$ -Gesamtstroms registriert. Diese Zunahme des Gesamtstroms beruhte auf einer gesteigerten Funktion spannungsunabhängiger  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Kanäle vom  $\text{IK}_{\text{Ca}}$ -Typ, wobei der  $\text{Kv}1.3$ -Strom unverändert blieb. Der  $\text{IK}_{\text{Ca}}$ -Kanal stellt hier den dominierenden Strom in aktivierten T-Lymphozyten dar. Die im Rahmen der vorliegenden Studie durchgeführten pharmakologischen Untersuchungen an den OKT3-aktivierten Lymphozyten gesunder Probanden ergaben, dass dieser  $\text{IK}_{\text{Ca}}$ -Strom durch das für  $\text{IK}_{\text{Ca}}$ -Kanäle hochselektive und hochaffine TRAM-34, einem Clotrimazolanalogon, inhibiert wurde (Wulff et al., 2000).

Bei einer Tram-34 Konzentration von 25 nM konnte der Kaliumausstrom nahezu vollständig inhibiert werden. Dieser Wert tendenziell niedriger als die in der Literatur beschriebenen Angaben mit  $\text{K}_\text{D}$ -Werten von 25-80 nM, die für die Inhibition von  $\text{IK}_{\text{Ca}}$ -Kanälen an T-Lymphozyten (Wulff et al., 2000; Logsdon et al., 1997) und am klonierten Kanal (Ishii et al., 1997) ermittelt wurden. Allerdings zeigt sich in den verschiedenen Untersuchungen eine starke Schwankungsbreite in Bezug auf die Konzentrationsangaben.

Das elektrophysiologische und pharmakologische Profil dieses Aktivierungs-abhängigen  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -Stroms, das für den  $\text{IK}_{\text{Ca}}$ -Kanal charakteristisch ist, weist somit die funktionelle Expression des  $\text{IK}_{\text{Ca}}$ -Kanals in proliferierenden Lymphozyten nach *in vitro* Stimulation nach. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die die Zunahme der  $\text{IK}_{\text{Ca}}$ -Funktion bei *in vitro* aktivierten Lymphozyten nachweisen konnten (Ghanshani et al., 2000).

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität des  $\text{IK}_{\text{Ca}}$ -Kanals wurde in der eigenen Arbeitsgruppe anhand von proliferierenden glatten Gefäßmuskulzellen untersucht, wobei ein  $\text{EC}_{50}$ -Wert von  $0,5 \pm 0,032 \mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_i$  ermittelt werden konnte (Köhler et al., 2003). Vergleichbare  $\text{EC}_{50}$ -Werte wurden auch für  $\text{IK}_{\text{Ca}}$ -Kanäle in humanen Lymphozyten erhoben (Ghanshani et al., 2000; Khanna et al., 1999; Logsdon et al., 1997). Die gegenüber anderen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig öffnenden Kanälen wie dem  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  bedeutend höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität

impliziert, dass  $IK_{Ca}$ -Kanäle bereits durch wesentlich geringere Erhöhungen der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration aktiviert werden und aufgrund der fehlenden Spannungsabhängigkeit auch im negativen Potentialbereich aktiv sind und so eine stärkere Hyperpolarisation induzieren können, als  $K_v$  oder  $BK_{Ca}$ -Kanäle, die bei negativen Potentialen inaktiviert sind. Daraus lässt sich im weiteren schlussfolgern, dass bzgl. der  $K_{Ca}$ -Expression  $IK_{Ca}$ -positive Zellen gegenüber  $IK_{Ca}$ -negativen Zellen über eine verbesserte Hyperpolarisationsfähigkeit verfügen, welche essentiell für den zur Lymphozytenaktivierung benötigten  $Ca^{2+}$ -Einstrom ist (Khanna et al, 1999; Lewis et al, 1995; Lin et al, 1993).

## **4.2 Patientenstudie**

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die elektrophysiologische Charakterisierung von Lymphozyten nierentransplantierter Patienten.

### **4.2.1 Patientenstudie zur Funktion T-lymphozytärer $K^+$ -Kanäle nach Nierentransplantation bei Patienten ohne Transplantatrejektion**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von Kaliumkanälen in Lymphozyten bei Patienten nach Nierentransplantation elektrophysiologisch untersucht.

Im postoperativen Verlauf bei Patienten ohne Transplantatrejektion zeigte sich hier bei unveränderter  $IK_{Ca}$ -Funktion ein signifikanter Anstieg der funktionellen Expression spannungsabhängiger Kaliumkanäle ( $K_v$ ). Im Vergleich mit den präoperativ erhobenen Ergebnissen konnte bei den rejektionsfreien, hinsichtlich der Nierenfunktion stabilen Patienten 21 Tage nach erfolgter Transplantation eine Zunahme der Stromstärke um 39 pA/pF gemessen werden. In der vorliegenden Arbeit geht eine stabile Transplantatfunktion somit mit einer erhöhten  $K_v$ - und einer unveränderten  $IK_{Ca}$ -Funktion einher.

Die Bedeutung dieser Befunde ist nicht genau geklärt. Im Gegensatz dazu konnte in mehreren Arbeiten bereits gezeigt werden, dass auch der  $K_v1.3$  bei der Aktivierung von T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle spielt. Bei Ratten mit Autoimmunenzephalopathie, einem Tiermodell der Multiple Sklerose, deutet eine erhöhte  $K_v$ -Funktion auf chronisch aktivierte Lymphozyten und eine erhöhte Krankheitsaktivität hin (Beeton et al., 2001). Durch den Einsatz relativ spezifischer

Inhibitoren des Kanals wie Kaliotoxin oder ShK-Dap<sup>22</sup> konnte in mehreren *in vitro* Studien die Proliferation und IL-2 Ausschüttung von stimulierten Lymphozyten gehemmt werden (Beeton et al., 2001; Kalman et al., 1998). Außerdem konnte durch Applikation dieser Blockersubstanzen eine symptomatische Verbesserung bei Ratten mit experimenteller Autoimmunenzephalopathie erreicht werden (Beeton et al., 2001; Koo et al., 1997, 1999).

Bei frisch isolierten humanen Lymphozyten wurde eine solche Kv-Regulation bisher nicht untersucht oder beschrieben.

#### **4.2.2 Patientenstudie zur Funktion T-lymphozytärer K<sup>+</sup>-Kanäle bei Patienten mit akuter Nierentransplantatrejektion**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die funktionelle Expression von IK<sub>Ca</sub>-Kanälen während einer akuten Transplantatrejektion überprüft.

In den elektrophysiologischen Experimenten an humanen Lymphozyten konnte gezeigt werden, dass die Funktion und das Expressionsmuster Ca<sup>2+</sup>-abhängiger K<sup>+</sup>-Kanäle bei Patienten mit bioptisch gesicherter akuter Transplantatrejektion im Vergleich zu Patienten ohne Transplantatrejektion wesentlich verändert ist:

Während in der Gruppe der Patienten ohne akute Transplantatrejektion über den gesamten postoperativen Verlauf eine unveränderte IK<sub>Ca</sub>-Funktion beobachtet wurde, wurde bei den Patienten mit akuter Transplantatrejektion ein signifikanter Anstieg der IK<sub>Ca</sub>-Funktion festgestellt.

Bei T-Lymphozyten am Tag 0 der Rejektion, also dem Tag der klinischen Diagnosestellung, wurde im Vergleich mit Zellen von Patienten ohne akute Rejektion bei vergleichbarem zeitlichen Abstand zur Transplantation eine um 7 pA/pF erhöhte Amplitude des IK<sub>Ca</sub>-Stroms registriert, was auf eine gesteigerte funktionelle Expression der T-lymphozytären IK<sub>Ca</sub>-Kanäle während einer akuten Transplantatrejektion im Vergleich zu T-Lymphozyten von Patienten ohne Rejektionszeichen hinweist.

Dass es sich hierbei tatsächlich um einen gesteigerten Strom durch IK<sub>Ca</sub>-Kanäle handelt, konnte pharmakologisch durch die Inhibition des Stroms durch den selektiven IK<sub>Ca</sub>-Inhibitor TRAM-34 nachgewiesen werden. Aufgrund dieses elektrophysiologischen und pharmakologischen Stromprofils konnten wir eine erhöhte funktionelle Expression des IK<sub>Ca</sub>-Kanals in Lymphozyten während einer akuten Transplantatrejektion nachweisen.

Bedeutsam ist, dass dieser Anstieg von  $IK_{Ca}$ -Funktionen bereits vor der klinischen Diagnosestellung einer akuten Transplantatrejektion beobachtet wurde, d.h. vor dem Anstieg des Serumkreatinins und der darauf folgenden Diagnosestellung mittels Transplantatnierenbiopsie. Im Vergleich zu den präoperativ erhobenen Werten zeigte sich bereits ab dem 7. postoperativen Tag ein signifikanter Anstieg der  $IK_{Ca}$ -Funktion.

Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Hochregulation des  $IK_{Ca}$ -Kanals in humanen Lymphozyten bei akuter Transplantatrejektion *in vivo* korrespondiert gut mit Beobachtungen an proliferierenden humanen T-Lymphozyten *in vitro*. Auch im Rahmen von tierexperimentellen Studien sowie in Untersuchungen an mitogen-stimulierten Zellen anderer Gewebe *in vitro* und *in vivo* wurde eine Hochregulation des  $IK_{Ca}$ -Kanals beobachtet. So zeigten Arbeiten von Deutsch et al. (1986) sowie Grissmer et al. (1993), dass in ruhenden Lymphozyten der Kv-Strom die Hauptkomponente des  $K^+$ -Gesamtstroms darstellt, während in *in vitro* proliferierenden Lymphozyten die  $IK_{Ca}$ -Kanalfunktion signifikant zunimmt (Deutsch et al., 1986; Grissmer et al., 1993). Darüber hinaus zeigten Untersuchungen an proliferierenden und dedifferenzierten glatten Gefäßmuskelzellen (Neylon et al., 1999) und Wachstumsfaktor-stimulierten Fibroblasten (Peña et al., 2000), dass das mitogen-induzierte Wachstum und die Proliferation von Zellen mit einer Hochregulation des  $IK_{Ca}$ -Kanals einhergehen. Diese Befunde lassen vermuten, dass der  $IK_{Ca}$ -Kanal an der Steuerung der Zellproliferation maßgeblich beteiligt ist.

In der Patientengruppe mit akuter Transplantatrejektion konnte im postoperativen Verlauf keine Veränderung der Kv-Funktion festgestellt werden. Lediglich am Tag der Diagnosestellung einer akuten Transplantatrejektion zeigte sich auch bei einem Haltepotential von 0 mV eine signifikant erhöhte Stromamplitude. Die zu diesem Zeitpunkt nachgewiesene gesteigerte  $IK_{Ca}$ -Funktion führt ebenfalls zu einem deutlich gesteigerten  $K^+$ -Gesamtstrom, so dass eine gesteigerte Kv-Funktion zum Zeitpunkt der Rejektion nicht sicher nachgewiesen werden konnte.

### **4.2.3 Verlauf der Funktion T-lymphozytärer $K^+$ -Kanäle der nach erfolgreicher Rejektionstherapie**

Bei erfolgreicher Therapie der Rejektion, erkennbar an einem signifikanten Abfall des Serumkreatinins, konnte bereits 2 Tage nach Therapiebeginn ein Abfall des  $IK_{Ca}$ -Stroms auf präoperativ erhobene Werte dieser Patienten detektiert werden. Somit korreliert auch hier die  $IK_{Ca}$ -Funktion mit dem Verlauf der akuten Transplantatrejektion und könnte auch hier einen zusätzlichen Marker für eine erfolgreiche Rejektionstherapie darstellen.

### **4.2.4 Vergleich der $IK_{Ca}$ -Funktion der beiden Patientengruppen**

Im Vergleich der präoperativ erhobenen Befunde zeigte sich, dass die  $IK_{Ca}$ -Funktion in der Gruppe der Patienten ohne spätere Transplantatabstoßung höher war als bei Patienten, die postoperative eine akute Transplantatrejektion entwickelten. Es könnte hier spekuliert werden, dass diese relativ erhöhte Expression des  $IK_{Ca}$ -Kanals möglicherweise protektiv bezüglich einer akuten Rejektion wirkt. Möglich wäre auch, dass diese Patienten mit einer initial höheren  $IK_{Ca}$ -Funktion besser auf die applizierte Immunsuppression ansprechen. Diese Interpretation ist allerdings zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch spekulativ und kann mit den Resultaten oder Befunden der vorliegenden Studie nicht beantwortet werden. Dies muss daher in weiteren Studien verifiziert werden.

Im weiteren postoperativen Verlauf unterschieden sich die beiden Patientengruppen bis zum Tag der Rejektion hinsichtlich der  $IK_{Ca}$ -Funktion nicht signifikant.

### **4.2.5 Vergleich der $K_v$ -Funktion der beiden Patientengruppen**

Im Gegensatz zu Unterschieden der  $IK_{Ca}$ -Funktion konnte in der vorliegenden Arbeit präoperativ kein Unterschied in beiden Patientenkollektiven hinsichtlich der  $K_v$ -Funktion gezeigt werden.

Im postoperativen Verlauf konnte wie beschrieben im Patientenkollektiv ohne akute Transplantatrejektion ein kleiner, jedoch statistisch signifikanter Anstieg des  $K_v$ -Gesamtstroms bei jedoch unveränderter  $IK_{Ca}$ -Funktion registriert werden. In der Gruppe

mit Transplantatrejektion blieb der Kv-Gesamtstrom bis zum Tag der Rejektion konstant.

Signifikante Unterschiede im Vergleich der beiden Gruppen fanden sich diesbezüglich am 14. postoperativen Tag. Hier zeigte sich in der Gruppe ohne Transplantatrejektion eine um 31 pA/pF signifikant höhere Stromamplitude. Anhand der elektrophysiologischen Charakteristika sowie exemplarisch durchgeführten Blockerexperimenten konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um eine gesteigerte Funktion des Kv1.3-Kanals handelt.

Diese Beobachtung steht wie der Anstieg der Kv-Funktion im postoperativen Verlauf der Patientengruppe ohne Transplantatrejektion im Gegensatz zu tierexperimentellen Studien. Wie beschrieben konnte im Gegensatz zu diesem Ergebnis durch eine Blockade der Kv-Kanäle eine verminderte Lymphozytenaktivierung sowie eine Verbesserung der klinischen Symptome bei Autoimmunenzephalitis bei der Ratte nachgewiesen werden (Beeton et al., 2001).

Untersuchungen der Kv-Funktion von humanen T-Lymphozyten *in vivo* im Rahmen einer Immunreaktion wie in der vorliegenden Arbeit liegen bisher nicht vor.

#### **4.2.6 Bedeutung der Befunde**

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass bei einer akuten Transplantatabstoßung eine signifikante Veränderung der  $IK_{Ca}$ -Funktion auftritt.

*In vitro* wurde bereits mehrfach eine Zunahme der  $IK_{Ca}$ -Funktion bei proliferierenden und aktivierten Lymphozyten nachgewiesen. Dabei konnte ebenfalls gezeigt werden, dass durch Blockade der  $IK_{Ca}$ -Kanäle eine weitere Proliferation aktivierter Lymphozyten inhibiert werden kann (Ghanshani et al., 2000). In der aktuellen Arbeit konnte erstmals im Rahmen einer klinischen Krankheitsstudie beim Menschen eine Hochregulation von  $IK_{Ca}$ -Kanälen in Abhängigkeit von einer T-lymphozytären Immunantwort gezeigt werden.

Hinweise auf die Bedeutung einer solchen Beteiligung einer IK-Regulation ergeben auch erste tierexperimentelle *in vivo* Studien mit selektiven  $IK_{Ca}$ -Blockern: So konnten Reich und Mitarbeiter zeigen, dass bei experimenteller Autoimmunenzephalitis in



Mäusen, einem Tiermodell der Multiplen Sklerose, durch Applikation des  $IK_{Ca}$ -Blocker TRAM-34 die Konzentration von Akute Phase Proteinen wie TNF $\alpha$  verringert und die Symptome der Erkrankung gebessert wurden (Reich et al., 2005).

Die funktionelle Bedeutung einer solchen Hochregulation des  $IK_{Ca}$  konnte auch durch Arbeiten von Köhler et al. in einem weiteren experimentellen Modell nachgewiesen werden. Köhler et al. zeigten eine Zunahme der  $IK_{Ca}$ -Funktion in neointimalen Gefäßmuskelzellen nach Ballonkatheterdilatation im Rattenmodell und wiesen gleichzeitig eine Reduktion der Restenose durch TRAM-34 und Clotrimazol nach (Köhler et al., 2003).

Bezüglich des Wirkmechanismus kann davon ausgegangen werden, dass ein erhöhter Kaliumausstrom durch eine vermehrte Anzahl von  $IK_{Ca}$ -Kanälen und die damit einhergehende erhöhte Hyperpolarisationsfähigkeit der Zellen mit konsekutiv verbessertem membranpotentialabhängigen  $Ca^{2+}$ -Einstrom maßgeblich die Proliferation und Aktivierung humaner Lymphozyten steuert. Ein kontinuierlicher Calciumeinstrom ist für die Lymphozyten insbesondere relevant, da diese nur geringe intrazelluläre Calciumspeicher aufweisen, jedoch die wesentlichen Transduktionskaskaden und Proliferationsvorgänge  $Ca^{2+}$ -abhängig ablaufen.

Insgesamt ergibt sich weiterhin, dass daher  $IK_{Ca}$ -Kanäle nicht nur als diagnostischer Marker von Bedeutung sein könnten, sondern eine neue therapeutische Zielstruktur zur Behandlung einer akuten Transplantatrejektion nach Nierentransplantation darstellen könnten. Eine pharmakologische Blockade des  $IK_{Ca}$  mittels selektiver  $IK_{Ca}$ -Blocker wie CLT oder dem CLT-Derivat TRAM-34 (Wulff et al., 2000) könnte demnach eine neue therapeutische Strategie zur Unterdrückung der Lymphozytenaktivierung darstellen und damit zur Behandlung und möglicherweise auch Prävention der akuten Rejektion nach Nierentransplantation eingesetzt werden.

Zu bedenken bleibt, dass vermutlich auch eine Lymphozytenaktivierung bedingt durch eine bakterielle oder virale Infektion mit einer Aktivierung der  $IK_{Ca}$ -Funktion einhergehen könnte und somit diese Aktivierung möglicherweise mit einer niedrigen Spezifität hinsichtlich der akuten Transplantatrejektion einhergeht. Der Umfang dieser Arbeit reicht jedoch prinzipiell nicht aus, um diese Frage endgültig zu beantworten. Jedoch fand sich bei den 14 rejektionsfreien Patienten, bei denen während des

Beobachtungszeitraums eine virale bzw. bakterielle Infektion auftrat, keine Änderung des T-lymphozytären Kanalmusters.

### **4.3. Stellenwert der Ergebnisse**

Die akute Transplantatrejektion ist ein komplexer Prozess, bei welchem viele verschiedene Faktoren den Verlauf und die Ausprägung der Abstossungsreaktion beeinflussen. Ihre genauen Ursachen sowie der Ablauf der Reaktion sind weiterhin nicht vollständig bekannt. Mit verschiedensten Protokollen der immunsuppressiven Therapie wird versucht, ein Gleichgewicht zwischen einer erhaltenen Immunkompetenz einerseits und einer ausreichenden Immunsuppression andererseits zu schaffen, um akute Rejektionen zu verhindern.

Während auf dem Gebiet der Immunsuppression in den letzten Dekaden enorme Fortschritte erzielt wurden und auf diese Weise ein Rückgang der akuten Rejektionen von ca. 50% der transplantierten Nieren vor 30 Jahren auf aktuell 17% zu verzeichnen ist, konnten bezüglich der Diagnostik akuter Rejektionen bisher keine entscheidenden Neuerungen etabliert werden (BQS-Bundesauswertung 2006).

Ein Anstieg der Serumkreatininkonzentration ist ein Hinweis für ein zunehmendes Transplantatversagen. Neben einer akuten Rejektion kommt hier ursächlich unter anderem jedoch auch eine Calcineurininhibitortoxizität in Betracht so dass zur definitiven Diagnosestellung die Nierenbiopsie weiterhin von entscheidender Bedeutung ist (Strom, 2005).

Da die Indikation zur Nierenbiopsie erst nach Verdacht auf eine akute Transplantatrejektion, hervorgerufen durch einen signifikanten Nierenparenchymschaden und den dadurch hervorgerufenen Serumkreatininanstieg, erfolgt, ist es nicht verwunderlich, dass auch bei maximaler Therapie meist nur ein Teil der Transplantatfunktion wieder hergestellt werden kann. Etablierte frühe klinische Rejektionsmarker fehlen und müssen auf experimenteller Basis entwickelt und in klinischen Studien evaluiert werden.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen einen Anstieg der  $IK_{Ca}$ -Funktion bei akuter Transplantatrejektion bereits vor klinisch apparenter Transplantatschädigung. Inwieweit diese Erkenntnisse zur früheren Diagnosestellung einer akuten Rejektion oder zur Therapie beitragen können, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

## 5 Zusammenfassung

Die Nierentransplantation ermöglicht terminal niereninsuffizienten Patienten ein Leben unabhängig von der Dialyse. Eine häufige und sowohl klinisch als auch ökonomisch relevante Komplikation der Transplantation stellt jedoch die akute Transplantatrejektion dar, die innerhalb von Wochen bis Monaten nach der Transplantation auftritt und einen entscheidenden Einfluss auf das Langzeitüberleben des Transplantats hat.

Die akute Rejektion wird derzeit durch eine nachlassende Nierenfunktion und einen Anstieg des Serumkreatinins und endgültig durch das histopathologische Ergebnis der Biopsie diagnostiziert. Der Großteil der Rejektionen lässt sich erfolgreich mit einer Prednisolon-Bolus-Therapie behandeln. Allerdings erfolgt die Diagnose erst spät im Verlauf der Rejektion, da klinisch einsetzbare frühe Marker fehlen.

Erste *in vitro* Untersuchungen deuten darauf hin, dass neben zahlreichen anderen Faktoren  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Kaliumkanäle an der Aktivierung der Lymphozyten beteiligt sind, indem sie über eine modifizierte Expression und Funktion proliferative Vorgänge induzieren und regulieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels *Whole-cell*-Patch-Clamp-Methodik die Funktion von  $\text{K}^+$ -Kanälen in T-Lymphozyten gesunder Probanden sowie nierentransplanterter Patienten im postoperativen Verlauf analysiert. Die Untersuchungen wurden präoperativ sowie am Tag 1, 3, 7, 14 und 21 sowie bei bioptisch bestätigter akuter Transplantatrejektion an den Tagen 0, 2, 6 und 12 durchgeführt.

Aus den durchgeführten Experimenten ließen sich folgende Hauptbefunde erheben:

Im Rahmen der Patch-Clamp-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass in frisch isolierten T-Lymphozyten gesunder Probanden der Kv-Strom die Hauptkomponente des  $\text{K}^+$ -Gesamtstroms darstellt, wobei der Kv anhand seiner charakteristischen elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften identifiziert werden konnte. Bei mit  $\text{OKT}_3$  *in vitro* aktivierten Lymphozyten setzt sich der  $\text{K}^+$ -Gesamtstrom aus dem Kv und dem kalziumabhängigen  $\text{K}^+$ -Kanal  $\text{IK}_{\text{Ca}}$  zusammen, der ebenfalls

anhand seiner charakteristischen elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften identifiziert werden konnte.

Bei nierentransplantierten Patienten ohne akute Transplantatrejektion kommt es im postoperativen Verlauf zu einer Zunahme der Kv-Aktivität. Dagegen beobachtet man bei Patienten mit akuter Rejektion eine Zunahme des  $IK_{Ca}$ -Stroms. Unter Therapie nimmt die Aktivität der  $IK_{Ca}$ -Kanäle wieder auf die präoperativ erhobenen Werte ab. Dieser Anstieg der  $IK_{Ca}$ -Funktion zeigte sich bereits am 7. postoperativen Tag.

Die Befunde dieser Arbeit deuten darauf hin, dass ein Anstieg des  $IK_{Ca}$  als Hinweis auf eine akute Rejektion gewertet werden könnte. Ein Anstieg der Kv-Funktion hingegen korreliert mit einer stabilen Transplantatfunktion.

Durch Anwendung hochselektiver  $IK_{Ca}$ -Kanalblocker wie TRAM-34 könnte eventuell die Induktion von  $IK_{Ca}$ -Expression und -Funktion inhibiert werden und somit die Proliferation und Aktivierung von Lymphozyten mit konsekutiver akuter Transplantatrejektion verhindert werden.

## Abstract

Acute rejection is a major prognostic factor for long term renal transplant survival. A reliable, sensitive, and specific early marker for acute rejection is still missing. In the cellular mechanism of the immune response, up-regulation of  $K^+$  channel functions is an early and crucial step in the activation of T-lymphocytes by promoting membrane potential-driven  $Ca^{2+}$ -influx and cell proliferation.

In the present study it was tested whether  $K^+$  channel function is altered after renal transplantation.

Methods: 46 patients were studied longitudinally after renal transplantation for a follow-up period of 21 days. 6 of these patients developed acute renal allograft rejection as determined by histologic analysis of renal biopsies. In addition we includes 5 other patients who were hospitalised within the study period due to an acute renal allograft rejection. Functional expression of the  $K^+$  channels in T-lymphocytes from peripheral blood was analysed before transplantation, and on predefined days 1, 3, 7 and 14 up to 21 days after transplantation, and during acute rejection on day 0, 2 and 6 by use of the patch-clamp technique.

Results: T-lymphocytes expressed two types of  $K^+$ -channels with the characteristics of the voltage-gated  $K^+$ -channel (Kv1.3) and the intermediate-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$ -channel ( $IK_{Ca}$ ). The Kv1.3 current was found to be the predominant  $K^+$ -current in T-lymphocytes of healthy individuals as well as in patients with chronic kidney disease before transplantation. The  $IK_{Ca}$  current component was low.

After renal transplantation  $IK_{Ca}$  functions remained constant in T-lymphocytes from patients without acute renal allograft rejection. In contrast, in T-lymphocytes from patients with acute renal allograft rejection, we observed a significant increase in  $IK_{Ca}$  -

currents.  $IK_{Ca}$  function returned to the level before rejection after immunosuppressive therapy.

Regarding the  $Kv1.3$  current we saw a significant increase in T-lymphocytes from patients without acute renal allograft rejection. In T-lymphocytes from patients with acute allograft rejection the  $Kv1.3$  function remained constant until the day of the rejection. At this point we also observed a significant increase of the  $Kv1.3$  current.

Comparing the two groups before transplantation it could be shown that the group without rejection showed a slight but significant upregulation of the  $IK_{Ca}$ -function.

Conclusion: The steep up-regulation of  $IK_{Ca}$  -currents in T-lymphocytes from patients developing acute renal allograft rejection could serve as a new diagnostic marker. Moreover, blockade of the  $IK_{Ca}$  by highly selective inhibitors might represent a new pharmacotherapeutical strategy in the prevention of acute renal allograft rejection.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] **Attali B**, Romey G, Honore E, Schmid-Alliana A, Mattei MG, Lesage F, Ricard P, Barhanin J, Lazdunski M. Cloning, functional expression, and regulation of two K<sup>+</sup> channels in human T lymphocytes. *J Biol Chem*. 1992 Apr 25;267(12):8650-7.
- [2] **Basadonna GP**, Matas AJ, Gillingham KJ, Payne WD, Dunn DL, Sutherland DE, Gores PF, Gruessner RW, Najarian JS. Early versus late acute renal allograft rejection: impact on chronic rejection. *Transplantation*. 1993 May;55(5):993-5.
- [3] **Beeton C**, Barbaria J, Giraud P, Devaux J, Benoliel AM, Gola M, Sabatier JM, Bernard D, Crest M, Beraud E. Selective blocking of voltage-gated K<sup>+</sup> channels improves experimental autoimmune encephalomyelitis and inhibits T cell activation. *J Immunol*. 2001 Jan 15;166(2):936-44.
- [4] **Beeton C**, Wulff H, Barbaria J, Clot-Faybesse O, Pennington M, Bernard D, Cahalan MD, Chandy KG, Beraud E. Selective blockade of T lymphocyte K(+) channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Nov 20;98(24):13942-7.
- [5] **Blatz AL**, Magleby KL. Calcium-activated potassium channels. *Trends Neurosci*. 10:463-467, 1987.
- [6] **Bolotina VM**, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*. 368:850-853, 1994.
- [7] **BQS-Bundesauswertung 2006** Nierentransplantation / Nierenlebendspende Bundesgeschäftsstelle Qualitätssicherung, GGmbH, Düsseldorf
- [8] **Cahalan MD**, Chandy KG. Ion channels in the immune system as targets for immunosuppression. *Curr Opin Biotechnol*. 1997 Dec;8(6):749-56. Review.
- [9] **Cahalan MD**, Wulff H, Chandy KG. Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system. *J Clin Immunol*. 2001 Jul;21(4):235-52. Review.
- [10] **Cai YC**, Osborne PB, North RA, Dooley DC, Douglass J. Characterization and functional expression of genomic DNA encoding the human lymphocyte type n potassium channel. *DNA Cell Biol*. 1992 Mar;11(2):163-72.
- [11] **Cecka JM**, Terasaki PI. Early rejection episodes. *Clin Transpl*. 1989:425-34.
- [12] **Chang MC**, Khanna R, Schlichter LC. Regulation of Kv1.3 channels in activated human T lymphocytes by Ca(2+)-dependent pathways. *Cell Physiol Biochem*. 2001;11(3):123-34.
- [13] **DeCoursey TE**, Chandy KG, Gupta S, Cahalan MD. Voltage-gated K<sup>+</sup> channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature*. 1984 Feb 2-8;307(5950):465-8.



- [14] **Crespo M**, Pascual M, Tolkoff-Rubin N, Mauiyyedi S, Collins AB, Fitzpatrick D, Farrell ML, Williams WW, Delmonico FL, Cosimi AB, Colvin RB, Saidman SL. Acute humoral rejection in renal allograft recipients: I. Incidence, serology and clinical characteristics. *Transplantation*. 2001 Mar 15;71(5):652-8.
- [15] **Desai R**, Peretz A, Idelson H, Lazarovici P, Attali B.  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels in human leukemic Jurkat T cells. Molecular cloning, biochemical and functional characterization. *J Biol Chem*. 2000 Dec 22;275(51):39954-63.
- [16] **Deutsch C**, Krause D, Lee SC. Voltage-gated potassium conductance in human T lymphocytes stimulated with phorbol ester. *J Physiol*. 1986 Mar;372:405-23.
- [17] **Devor DC**, Singh AK, Frizzell RA, Bridges RJ. Modulation of  $\text{Cl}^{-}$  secretion by benzimidazolones. I. Direct activation of a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^{+}$  channel. *Am J Physiol*. 1996 Nov;271(5 Pt 1):L775-84.
- [18] **Douglass J**, Osborne PB, Cai YC, Wilkinson M, Christie MJ, Adelman JP. Characterization and functional expression of a rat genomic DNA clone encoding a lymphocyte potassium channel. *J Immunol*. 1990 Jun 15;144(12):4841-50.
- [19] **Fanger CM**, Rauer H, Neben AL, Miller MJ, Rauer H, Wulff H, Rosa JC, Ganellin CR, Chandy KG, Cahalan MD. Calcium-activated potassium channels sustain calcium signaling in T lymphocytes. Selective blockers and manipulated channel expression levels. *J Biol Chem*. 2001 Apr 13;276(15):12249-56. Epub 2001 Jan 22.
- [20] **Feske S**, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M, Rao A. A mutation in *Orai1* causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*. 2006 May 11;441(7090):179-85.
- [21] **Fukushima Y**, Hagiwara S, Henkart M. Potassium current in clonal cytotoxic T lymphocytes from the mouse. *J Physiol*. 1984 Jun;351:645-56.
- [22] **Ghanshani S**, Wulff H, Miller MJ, Rohm H, Neben A, Gutman GA, Cahalan MD, Chandy KG. Up-regulation of the *IKCa1* potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences. *J Biol Chem*. 2000 Nov 24;275(47):37137-49.
- [23] **Grissmer S**, Ghanshani S, Dethlefs B, McPherson JD, Wasmuth JJ, Gutman GA, Cahalan MD, Chandy KG. The Shaw-related potassium channel gene, *Kv3.1*, on human chromosome 11, encodes the type I  $\text{K}^{+}$  channel in T cells. *J Biol Chem*. 1992 Oct 15;267(29):20971-9.
- [24] **Grissmer S**, Nguyen AN, Aiyar J, Hanson DC, Mather RJ, Gutman GA, Karmilowicz MJ, Auperin DD, Chandy KG. Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated  $\text{K}^{+}$  channels, types *Kv1.1*, *1.2*, *1.3*, *1.5*, and *3.1*, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol Pharmacol*. 1994 Jun;45(6):1227-34.

- [25] **Hamill OP**, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391:85-100, 1981.
- [26] **Heidbuchel H**, Vereecke J, Carmeliet E. Three different potassium channels in human atrium. Contribution to the basal potassium conductance. *Circ Res.* 1990 May;66(5):1277-86.
- [27] **Herrington J**, Sanchez M, Wunderler D, Yan L, Bugianesi RM, Dick IE, Clark SA, Brochu RM, Priest BT, Kohler MG, McManus OB. Biophysical and pharmacological properties of the voltage-gated potassium current of human pancreatic beta-cells. *J Physiol.* 2005 Aug 15;567(Pt 1):159-75. Epub 2005 Jun 2.
- [28] **Hill RJ**, Grant AM, Volberg W, Rapp L, Faltynek C, Miller D, Pagani K, Baizman E, Wang S, Guiles JW, et al. WIN 17317-3: novel nonpeptide antagonist of voltage-activated K<sup>+</sup> channels in human T lymphocytes. *Mol Pharmacol.* 1995 Jul;48(1):98-104.
- [29] **Hoffman JF**, Joiner W, Nehrke K, Potapova O, Foye K, Wickrema A. The hSK4 (KCNN4) isoform is the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel (Gardos channel) in human red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jun 10;100(12):7366-71. Epub 2003 May 28.
- [30] **Hoth M**, Penner R. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature.* 1992 Jan 23;355(6358):353-6.
- [31] **Hricik** Donald E, Kidney transplantation, 2003
- [32] **Ishii TM**, Silvia C, Hirschberg B, Bond CT, Adelman JP, Maylie J. A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 94:11651-11656, 1997.
- [33] **Jager H**, Dreker T, Buck A, Giehl K, Gress T, Grissmer S. Blockage of intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels inhibit human pancreatic cancer cell growth in vitro. *Mol Pharmacol.* 2004 Mar;65(3):630-8.
- [34] **Jensen BS**, Strobaek D, Olesen SP, Christophersen P. The Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel of intermediate conductance: a molecular target for novel treatments? *Curr Drug Targets.* 2001 Dec;2(4):401-22. Review.
- [35] **Kamoun M**. Cellular and molecular parameters in human renal allograft rejection. *Clin Biochem.* 2001 Feb;34(1):29-34. Review.
- [36] **Kalman K**, Pennington MW, Lanigan MD, Nguyen A, Rauer H, Mahnir V, Paschetto K, Kem WR, Grissmer S, Gutman GA, Christian EP, Cahalan MD, Norton RS, Chandy KG. ShK-Dap22, a potent Kv1.3-specific immunosuppressive polypeptide. *J Biol Chem.* 1998 Dec 4;273(49):32697-707.
- [37] **Khanna R**, Chang MC, Joiner WJ, Kaczmarek LK, Schlichter LC. hSK4/hIK1, a calmodulin-binding K<sub>Ca</sub> channel in human T-lymphocytes. Roles in proliferation and volume-regulation. *J Biol Chem.* 274:14838-14849, 1999.

- [38] **Thomas J. Kindt**, Richard A. Goldsby, Barbara A. Osborne, Janis Kuby. Immunology. Verlag: Palgrave Macmillan; Auflage: 6 (18. August 2006). Basingstoke, Hampshire
- [39] **Köhler R**, Wulff H, Eichler I, Kneifel M, Neumann D, Knorr A, Grgic I, Kämpfe D, Si H, Wibawa J, Real R, Borner K, Brakemeier S, Orzechowski HD, Reusch HP, Paul M, Chandy KG, Hoyer J. Blockade of the intermediate-conductance calcium-activated potassium channel as a new therapeutic strategy for restenosis. *Circulation*. 108:1119-1125, 2003.
- [40] **Koo GC**, Blake JT, Shah K, Staruch MJ, Dumont F, Wunderler D, Sanchez M, McManus OB, Sirotina-Meisher A, Fischer P, Boltz RC, Goetz MA, Baker R, Bao J, Kayser F, Rupprecht KM, Parsons WH, Tong XC, Ita IE, Pivnichny J, Vincent S, Cunningham P, Hora D Jr, Feeney W, Kaczorowski G, et al. Correolide and derivatives are novel immunosuppressants blocking the lymphocyte Kv1.3 potassium channels. *Cell Immunol*. 1999 Nov 1;197(2):99-107.
- [41] **Koo GC**, Blake JT, Talento A, Nguyen M, Lin S, Sirotina A, Shah K, Mulvany K, Hora D Jr, Cunningham P, Wunderler DL, McManus OB, Slaughter R, Bugianesi R, Felix J, Garcia M, Williamson J, Kaczorowski G, Sigal NH, Springer MS, Feeney W. Blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses in vivo. *J Immunol*. 1997 Jun 1;158(11):5120-8.
- [42] **Lewis RS**, Cahalan MD. Potassium and calcium channels in lymphocytes. *Annu Rev Immunol*. 1995;13:623-53. Review.
- [43] **Li B**, Hartono C, Ding R, Sharma VK, Ramaswamy R, Qian B, Serur D, Mouradian J, Schwartz JE, Suthanthiran M. Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Engl J Med*. 2001 Mar 29;344(13):947-54.
- [44] **Lin CS**, Boltz RC, Blake JT, Nguyen M, Talento A, Fischer PA, Springer MS, Sigal NH, Slaughter RS, Garcia ML, et al. Voltage-gated potassium channels regulate calcium-dependent pathways involved in human T lymphocyte activation. *J Exp Med*. 1993 Mar 1;177(3):637-45.
- [45] **Liou J**, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE Jr, Meyer T. STIM is a  $\text{Ca}^{2+}$  sensor essential for  $\text{Ca}^{2+}$ -store-depletion-triggered  $\text{Ca}^{2+}$  influx. *Curr Biol*. 2005 Jul 12;15(13):1235-41.
- [46] **Logsdon NJ**, Kang J, Togo JA, Christian EP, Aiyar J. A novel gene, *hkCa4*, encodes the calcium-activated potassium channel in human T-lymphocytes. *J Biol Chem*. 272: 32723-32726, 1997.
- [47] **MacDonald PE**, Ha XF, Wang J, Smukler SR, Sun AM, Gaisano HY, Salapatek AM, Backx PH, Wheeler MB. Members of the Kv1 and Kv2 voltage-dependent  $\text{K}^{+}$  channel families regulate insulin secretion. *Mol Endocrinol*. 2001 Aug;15(8):1423-35.

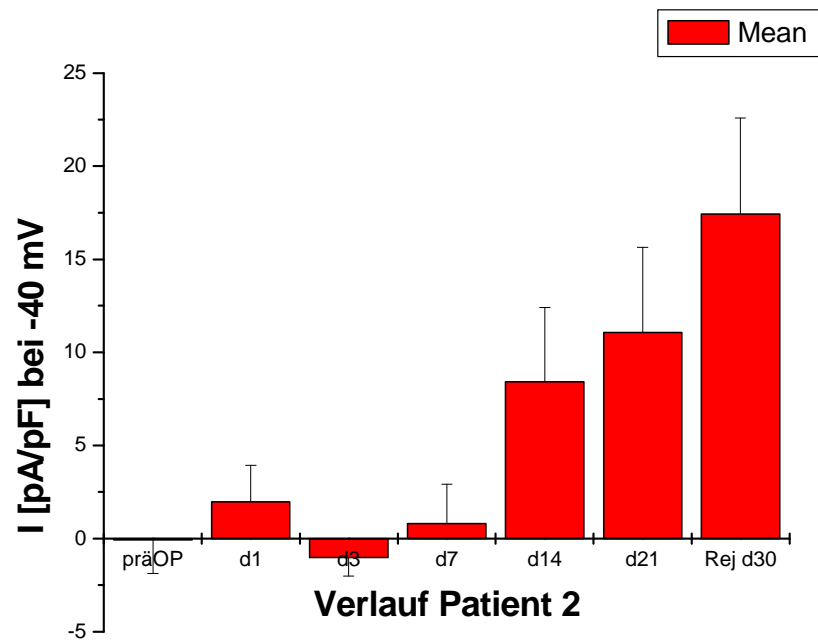
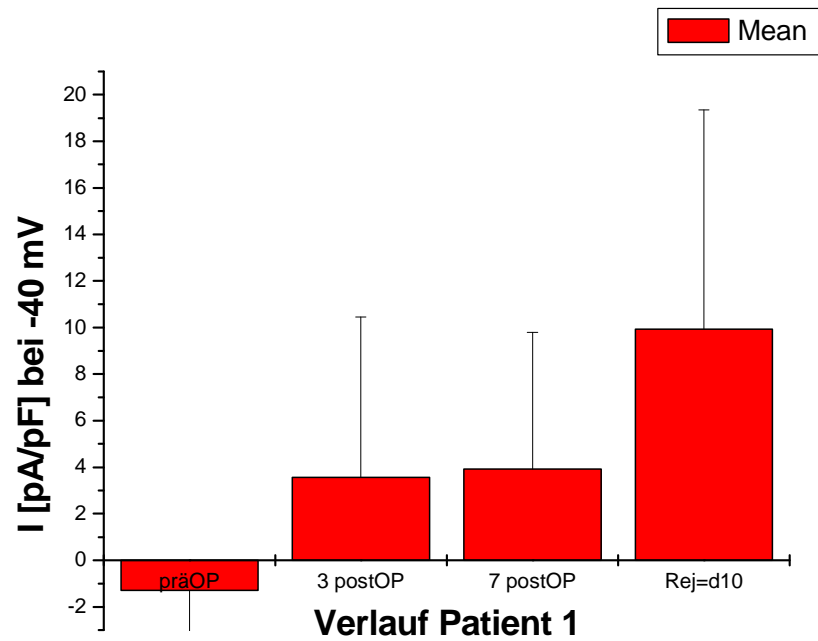
- [48] **Mathie A**, Woollorton JR, Watkins CS. Voltage-activated potassium channels in mammalian neurons and their block by novel pharmacological agents. *Gen Pharmacol*. 1998 Jan;30(1):13-24. Review.
- [49] **Matteson DR**, Deutsch C. K channels in T lymphocytes: a patch clamp study using monoclonal antibody adhesion. *Nature*. 1984 Feb 2-8;307(5950):468-71.
- [50] **Mauillyedi S**, Crespo M, Collins AB, Schneeberger EE, Pascual MA, Saidman SL, Tolckoff-Rubin NE, Williams WW, Delmonico FL, Cosimi AB, Colvin RB. Acute humoral rejection in kidney transplantation: II. Morphology, immunopathology, and pathologic classification. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Mar;13(3):779-87.
- [51] **Neher E**, Marty A. Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 Nov;79(21):6712-6.
- [52] **Neher E**, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*. 260:799-802, 1976.
- [53] **Nelson MT**, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol*. 268:C799-822, 1995.
- [54] **Nilius B**, Droogmanns G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev*. 8(4):1415-1459, 2001.
- [55] **Papazian DM**, Timpe LC, Jan YN, Jan LY. Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature*. 1991 Jan 24;349(6307):305-10.
- [56] **Parekh AB**. Cell biology: cracking the calcium entry code. *Nature*. 2006 May 11;441(7090):163-5.
- [57] **Peña TL**, Chen SH, Konieczny SF, Rane SG. Ras/MEK/ERK Up-regulation of the fibroblast K<sub>Ca</sub> channel FIK is a common mechanism for basic fibroblast growth factor and transforming growth factor- $\beta$  suppression of myogenesis. *J Biol Chem*. 275:13677-13682, 2000.
- [58] **Pietra BA**, Wiseman A, Bolwerk A, Rizeq M, Gill RG. CD4 T cell-mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II. *J Clin Invest*. 2000 Oct;106(8):1003-10.
- [59] **Pusch M**, Neher E. Rates of diffusional exchange between small cells and a measuring patch pipette. *Pflugers Arch*. 1988 Feb;411(2):204-11.
- [60] **Reich EP**, Cui L, Yang L, Pugliese-Sivo C, Golovko A, Petro M, Vassileva G, Chu I, Nomeir AA, Zhang LK, Liang X, Kozlowski JA, Narula SK, Zavodny PJ, Chou CC. Blocking ion channel KCNN4 alleviates the symptoms of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Eur J Immunol*. 2005 Apr;35(4):1027-36.

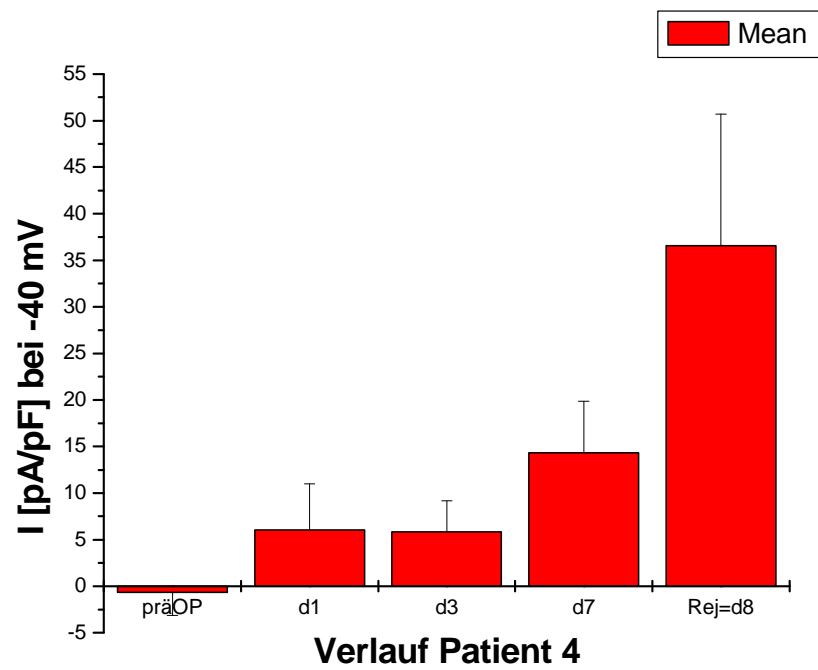
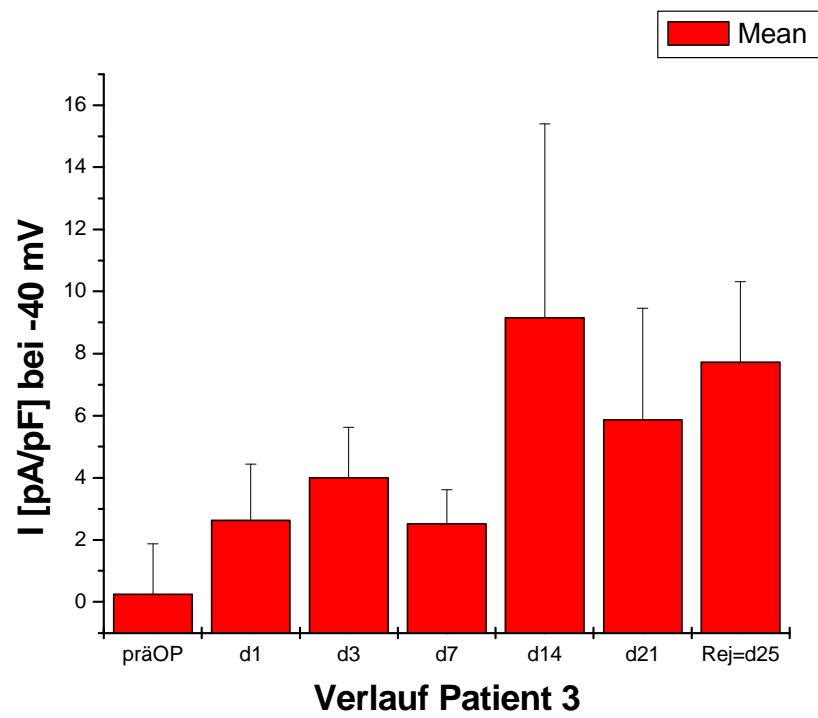
- [61] **Roos J**, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Lioudyno M, Zhang S, Safrina O, Kozak JA, Wagner SL, Cahalan MD, Velicelebi G, Stauderman KA. STIM1, an essential and conserved component of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channel function. *J Cell Biol.* 2005 May 9;169(3):435-45. Epub 2005 May 2.
- [62] **Rus H**, Pardo CA, Hu L, Darrah E, Cudrici C, Niculescu T, Niculescu F, Mullen KM, Allie R, Guo L, Wulff H, Beeton C, Judge SI, Kerr DA, Knaus HG, Chandy KG, Calabresi PA. The voltage-gated potassium channel Kv1.3 is highly expressed on inflammatory infiltrates in multiple sclerosis brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Aug 2;102(31):11094-9.
- [63] **Russell ME**, Wallace AF, Wyner LR, Newell JB, Karnovsky MJ. Upregulation and modulation of inducible nitric oxide synthase in rat cardiac allografts with chronic rejection and transplant arteriosclerosis. *Circulation.* 1995 Aug 1;92(3):457-64.
- [64] **Sayegh MH**, Watschinger B, Carpenter CB. Mechanisms of T cell recognition of alloantigen. The role of peptides. *Transplantation.* 1994 May 15;57(9):1295-302. Review.
- [65] **Sauvé R**, Chahine M, Tremblay J, Hamet P. Single-channel analysis of the electrical response of bovine aortic endothelial cells to bradykinin stimulation: contribution of a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^{+}$  channel. *J Hypertens* 8 Suppl:S193-201, 1990.
- [66] **Schlichter L**, Sidell N, Hagiwara S. K channels are expressed early in human T-cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Aug;83(15):5625-9.
- [67] **Seoh SA**, Sigg D, Papazian DM, Bezanilla F. Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker  $\text{K}^{+}$  channel. *Neuron.* 1996 Jun;16(6):1159-67.
- [68] **Shieh CC**, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev.* 2000 Dec;52(4):557-94. Review
- [69] **Strom TB**. Rejection-more than the eye can see. *N Engl J Med.* 2005 Dec 1;353(22):2394-6.
- [70] **Van Wauwe JP**, De Mey JR, Goossens JG. OKT3: a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties. *J Immunol.* 1980 Jun;124(6):2708-13.
- [71] **Vasconcellos LM**, Schachter AD, Zheng XX, Vasconcellos LH, Shapiro M, Harmon WE, Strom TB. Cytotoxic lymphocyte gene expression in peripheral blood leukocytes correlates with rejecting renal allografts. *Transplantation.* 1998 Sep 15;66(5):562-6. Erratum in: *Transplantation* 1998 Nov 15;66(9):1264.
- [72] **Vella J**, Koch M, Brennan D. Acute allograft rejection: Diagnosis. [www.upToDateonline.com](http://www.upToDateonline.com). Download am 27.11.2006

- [73] **Vig M**, Peinelt C, Beck A, Koomoa DL, Rabah D, Koblan-Huberson M, Kraft S, Turner H, Fleig A, Penner R, Kinet JP. CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry. *Science*. 2006 May 26;312(5777):1220-3.
- [74] **Wickenden A**.  $\text{K}(+)$  channels as therapeutic drug targets. *Pharmacol Ther*. 2002 Apr-May;94(1-2):157-82. Review.
- [75] **Wiland AM**, Fink JC, Weir MR, Philosophe B, Blahut S, Weir MR Jr, Copenhagen B, Bartlett ST. Should living-unrelated renal transplant recipients receive antibody induction? Results of a clinical experience trial. *Transplantation*. 2004 Feb 15;77(3):422-5.
- [76] **Wulff H**, Miller MJ, Hansel W, Grissmer S, Cahalan MD, Chandy KG. Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channel,  $\text{IKCa1}$ : a potential immunosuppressant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jul 5;97(14):8151-6.
- [77] **Wulff H**, Rauer H, During T, Hanselmann C, Ruff K, Wrisch A, Grissmer S, Hansel W. Alkoxypsoralens, novel nonpeptide blockers of Shaker-type  $\text{K}^{+}$  channels: synthesis and photoreactivity. *J Med Chem*. 1998 Nov 5;41(23):4542-9.
- [78] **Wulff H**, Beeton C, Chandy KG. Potassium channels as therapeutic targets for autoimmune disorders. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2003 Sep;6(5):640-7.
- [79] **Zweifach A**, Lewis RS. Mitogen-regulated  $\text{Ca}^{2+}$  current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Jul 1;90(13):6295-9.

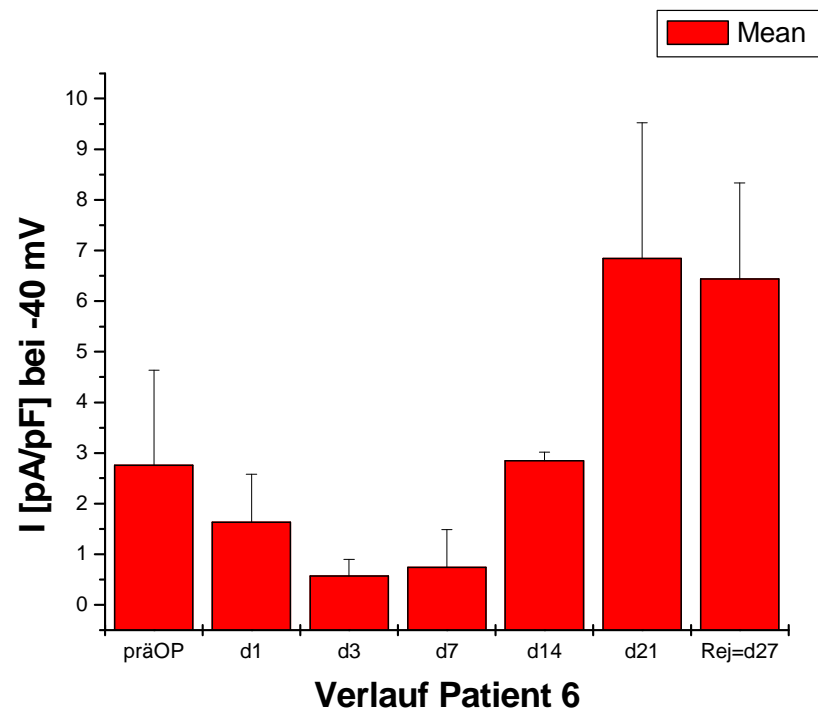
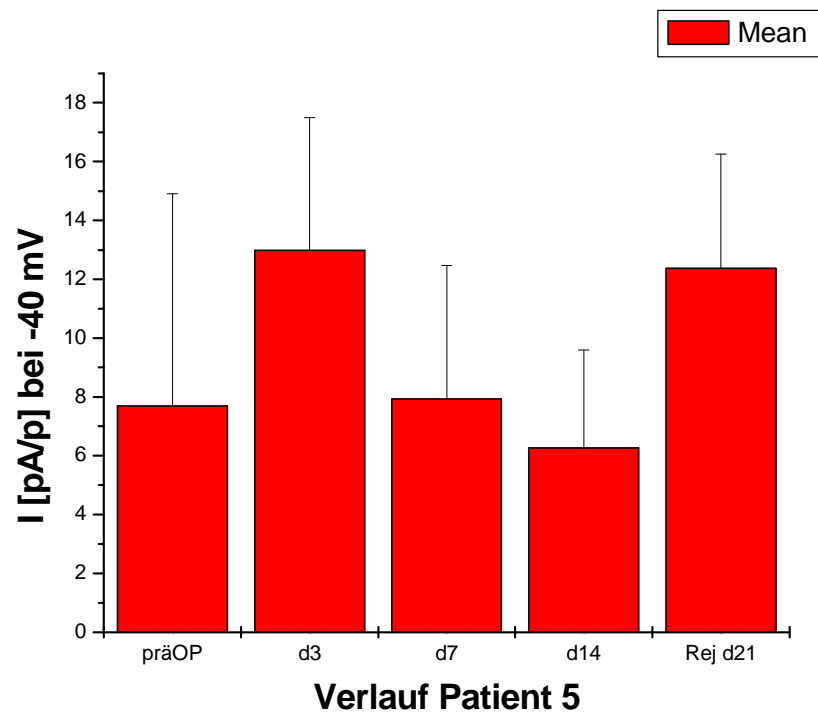
## 7 Anhang

Verlauf der einzelnen Patienten in der Gruppe mit akuter Transplantatrejektion.  
Dargestellt sind die Messungen bei -40 mV.









## 8 Akademische Lehrer

### Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren in Berlin

Anghelescu

Bauer

Blottner

Buhr

Förster

Hahn

Heuser

Hoyer

Kern

Köpf-Maier

Kreutz

Marx

Maxeiner

Mitznegg

Scherer

Siegel

Stein

Weber

## 9 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Joachim Hoyer für die Überlassung dieses interessanten Themas und die ausgezeichnete Betreuung dieser Arbeit. Insbesondere danke ich für die hervorragende Unterstützung in der Phase der Fertigstellung meiner Arbeit.

Frau Dr. med. Susanne Brakemeier und Herrn PD Dr. rer. nat. Ralf Köhler möchte ich für die hervorragende und intensive Unterstützung bei der Planung und Durchführung dieser Arbeit meinen herzlichsten Dank aussprechen.

Für die medizinisch-technische Assistenz bei der Durchführung der Experimente möchte ich mich bei Herrn Klaus Schlotter herzlich bedanken.

Frau Dr. med. Ines Eichler sowie meinen Mitdoktoranden Frau Andrea Knorr, Herrn Daniel Neumann und Herrn Ivica Grgic danke ich für die sehr gute und freundschaftliche Zusammenarbeit sowie die angenehme Arbeitsatmosphäre im Laboralltag.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinen Schwestern Birgit und Karin, die mich zu jeder Zeit während meines Studiums und bei der Erstellung der Doktorarbeit unterstützt haben.

## 10 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Hochregulation  $\text{Ca}^{2+}$  aktivierter  $\text{K}^+$  Kanäle in humanen T-Lymphozyten bei akuter Nierentransplantatrejektion“ in der Klinik für Innere Medizin Schwerpunkt Nephrologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Joachim Hoyer mit Unterstützung durch Frau Dr. Susanne Brakemeier und Herrn PD Dr. Ralf Köhler ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischem Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde bisher nicht in schriftlicher Form veröffentlicht.

Marburg, 19.03.09

Doris Kämpfe

## **Lebenslauf**

Entfernt für elektronische Version